Novembre-Décembre 1958

JOURNAL
DE
CHIMIE PHYSIQUE
ET DE
PHYSICO-CHIMIE BIOLOGIQUE

Fondé par Philippe A. GUYE

Tome 55 — N° 11-12

PÉRIODIQUE PUBLIÉ PAR LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE
avec le concours du Centre National de la Recherche Scientifique

Administration : 11, rue Pierre-Curie, Paris, 5e.

SOMMAIRE

8e RÉUNION (2e et dernière partie.)



COMPOSITION DU BUREAU ET DU CONSEIL

DE LA

SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE

POUR L'ANNÉE 1958-1959

Présidents d'Honneur : MM. E. Bauer, E. Briner, M. de Broglie, J. Duclaux, J. Timmermans.

Membres d'Honneur : MM. J. Hadamard, L. Pauling, Sir Eric Rideal, MM. A. Szent-Györgyi, A. Terenin.

Président	MM. G. Champetier
Vice-Président	R. Latarjet
Secrétaire Général	G. Emschwiller
Trésorier	M. Chatelet
Secrétaire-Adjoint	A. Saint Maxen

MEMBRES DU CONSEIL

Mlle M. Quintin
MM. M. Haïssinsky
A. Pacault
R. Paris
B. Pullman

MM. L. D'Or
M. Letort
M. Magat
R. Prudhomme
J. Tonnelat

MM. E. Calvet
P. Grabar
B. Imelik
A. Landucci
J.J. Trillat

ANCIENS PRÉSIDENTS

MM. M. de Broglie, J. Duclaux, R. Dubrisay, R. Wurmser, E. Bauer, M. Delépine, E. Fauré-Fremiet, J. Tréfouel, M. Abribat, A. Dognon, P. Laffitte. R. Lucas.

ANCIENS PRÉSIDENTS DÉCÉDÉS

MM. J. Perrin, G. Urbain, P. Langevin, A. Haller, A. Cotton, V. Henri, G. Darzens, H. Mouton, L. Lapicque, C. Moureu, A. Job, A. Mayer, H. Copaux, C. Mauguin, E. Darmois, F. Joliot, P. Jolibois, P. Job, R. Audubert.

8e RÉUNION DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE
des 27, 28, 29 et 30 mai 1958

TRANSFERTS D'ÉNERGIE LUMINEUSE ET PHOTOSENSIBILISATION

(2e et dernière partie.)

ÉTUDE ET SÉPARATION DES DIFFÉRENTS GENRES DE TRANSFERT ET DE DISSIPATION DE L'ÉNERGIE EXCITATRICE DES MOLÉCULES COMPLEXES DANS LES SOLUTIONS

par V. L. LEVCHINE et E. G. BARANOVA.

[*Institut de Physique* « P. N. LEBEDEV » *Académie des Sciences de l'U. R. S. S., Moscou.*]

SOMMAIRE

1° Dans les solutions concentrées de matières luminescentes l'extinction par concentration a un caractère complexe. Elle comprend une extinction par migration de l'énergie d'excitation de monomères à monomères, de monomères aux molécules associées non luminescentes et une extinction par absorption non active. Ces types d'extinction ont un développement relatif différent chez les diverses matières colorantes, cependant les matières colorantes ayant un seul type d'exctintion sont extrêmement rares. Mais on peut noter une importance prépondérante d'un facteur ou d'un autre dans les concentrations réalisées expérimentalement. Les différents types d'extinction indiqués peuvent être séparés les uns des autres.

2° Le transfert d'énergie de monomères à monomères mène seulement dans des cas exceptionnels à une extinction de la luminescence, d'où il résulte que le rôle de ces transferts dans l'extinction directe n'est pas considérable. Ils peuvent jouer un rôle comme transferts intermédiaires de l'énergie d'excitation aux molécules associées excentriques. Le transfert d'énergie de monomères à monomères amène une dépolarisation de la luminescence.

3° La migration de l'énergie des monomères luminescents aux molécules associées non luminescentes joue un rôle important dans le développement de l'extinction par concentration. Cette forme d'extinction peut être étudiée quantativement tant dans des solutions aqueuses que dans les sodutions alcooliques.

4° L'absorption non active joue un rôle considérable dans le développement de l'extinction par concentration. Elle a une importance particulièrement grande pour les solvants peu actifs. L'absorption non active se voit facilement d'après les déformations importantes des spectres d'absorption dans les solutions concentrées.

Les auteurs expriment leurs sincères remerciements à Mme. L. V. KROTOVA pour la part qu'elle a prise dans les expériences, et à Mlle O. V. CHALAEVA pour les mesures des durées de la luminescence des solutions.

Dans cette communication on examine les différentes formes de transfert de l'énergie excitatrice entre les molécules d'une substance luminescente en solution, menant à une dépolarisation et à une extinction de la luminescence. On établit une séparation de l'action de la migration de l'énergie de monomères à monomères et de monomères à dimères et à des molécules associées plus complexes, et aussi de l'action de l'absorption non active des molécules associées non luminescentes. Les indices caractéristiques de chacun des genres d'extinction de la luminescence sont indiqués.

Introduction.

Le transfert de l'énergie excitatrice d'une molécule luminescente à une autre joue un grand rôle dans le phénomène de luminescence. Dans sa forme visible, ce transfert est observé lors de l'apparition de la luminescence sensibilisée des molécules, quand la luminescence d'une molécule émettrice se produit au compte de l'énergie absorbée par une autre molécule. De nombreux cas de luminescence sensibilisée ont été étudiés par J. PERRIN (1) et par A. N. TERÉNINE et ses collaborateurs (2).

La migration de l'énergie excitatrice dans les cristaux mène à une dépolarisation de la luminescence. Ainsi, dans les expériences de N. D. JEVANDROV, avec une position donnée du cristal, le degré de polarisation de la luminescence de cristaux d'anthracène et autres s'est montré indépendant de la direction du vecteur lumineux de la lumière excitatrice, ce qui est possible seulement par transfert de l'énergie d'oscillateurs absorbant initialement à l'ensemble des oscillateurs du réseau correctement disposés (3).

Nous allons traiter principalement des questions de transfert d'énergie à des objets incapables de radiation, c'est-à-dire d'une migration de l'énergie menant à une extinction de la luminescence.

Extinction par concentration de la matière luminescente. — La diminution du rendement de la luminescence par augmentation de la concentration de la matière luminescente fut décrite déjà par Newton et étudiée par G. Stokes. Plus tard il apparut deux types d'explication de ce phénomène. L'un soulignait l'importance de l'action des transformations physicochimiques rèversibles se produisant dans une solution par augmentation de la concentration; l'autre était basée sur une représentation purement physique de la migration de l'énergie d'une molécule excitée à d'autres molécules semblables.

La présence de modifications physico-chimiques dans des solutions concentrées fut indiquée pour la première fois par Stenger ([4]), puis par B. Walter en 1887 ([5]). En 1927, ce point de vue fut à nouveau avancé par moi ([6]); dans ce dernier travail ([6]), la diminution du rendement de la luminescence fut rapportée à l'apparition de molécules associées non luminescentes dans la solution, conditionnant l'apparition d'une absorption non active.

Le second type d'explication purement physique, venait d'indications de J. Perrin ([7]) sur la possibilité d'une résonance d'induction entre des molécules luminescentes semblables. Ce point de vue fut quantativement développé par F. Perrin (1932) ([8]), puis il forma la base de la théorie quantitative de l'extinction de S. I. Vavilov (1942) ([9]), et de M. D. Galanine (1950) ([10]). Suivant les représentations des auteurs de ces travaux, une partie des transferts d'énergie de monomères à monomères s'accompagne d'extinction, dont la cause n'est cependant pas précisée. Ces représentations donnèrent la possibilité à S. I. Vavilov de décrire quantitativement le changement de rendement de la luminescence, la durée de l'état excité et la polarisation de la luminescence. Cependant elles ne peuvent expliquer les modifications des spectres d'absorption des solutions par augmentation de la concentration, la croissance de la luminescence des solutions par élévation de température et non plus la variation de l'extinction par concentration lorsqu'on excite la luminescence à des longueurs d'onde différentes.

Ces effets furent particulièrement soulignés dans les travaux d'un des auteurs ([6, 11]). Se basant sur des données expérimentales présentées dans ces travaux et sur l'idée de la possibilité d'une participation des dimères dans l'extinction par concentration-migration indiquée par F. Perrin ([12]) en 1929, F. Douchinsky ([13]) développa en 1937 une théorie dans laquelle l'extinction par concentration était reliée aux transferts de l'énergie aux molécules associées. Comme d'une part Douchinsky ne tint pas compte du rôle de l'absorption non active et, que d'autre part dans son développement de cette théorie il fit pour simplifier de nombreuses omissions, elle ne donna pas une juste représentation des processus de concentration; cependant, comme nous le verrons plus loin, le processus de transfert d'énergie d'excitation à des dimères existe et joue un grand rôle dans l'extinction de la luminescence.

Dans le travail d'un des auteurs ([14]), il fut montré que la nature de l'extinction par concentration n'est pas la même pour des cas différents et que l'extinction est conditionnée par plusieurs causes. La marche différente, parfois contraire, des processus de concentration dans des matières diverses avec modification de certains paramètres en est une preuve. Par exemple, l'augmentation de la concentration des solutions dans certains cas mène à l'extinction, dans d'autres elle a peu d'effet, dans des troisièmes cas elle exalte la luminescence (fig. 1). Un développement simultané de plusieurs processus d'extinction est très possible, et leur superposition est un phénomène ordinaire et non une exception ([14]). C'est pourquoi il est nécessaire pour l'étude de processus particuliers de trouver des méthodes pour leur séparation.

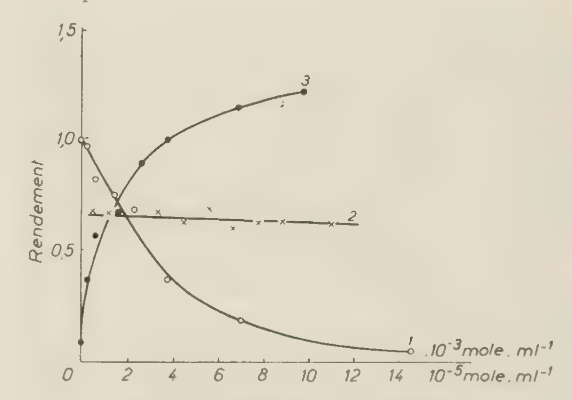


Fig. 1. — Modification du rendement de la luminescence dans les concentrations :

1. NH_4, fluorescine dans du sucre candi (Levchine).
2. Anthracène dans l'alcool éthylique (Chichlovsky).
3. Chlorure de diéthylthiocyanine dans l'eau (Derkatcheva).

L'échelle supérieure des abscisses se rapporte à 3.

L'étude de cette question a montré que les différentes notions sur les causes d'extinction qui se formèrent auparavant trouvent une confirmation. Les méthodes de séparation des différents processus d'extinction décrites ci-dessous ont permis d'établir leur importance relative dans des cas concrets.

Différents types d'extinction par concentration et leur méthodes de séparation. — Dans toute solution de concentration élevée, il existe trois processus d'extinction se superposant les uns les autres.

1. Extinction avec transfert par induction de l'énergie d'excitation d'un monomère à un autre (type 1).

2. Extinction avec transfert de l'énergie d'excitation à des dimères et associations plus complexes. Dans le cas d'associations non luminescentes ce transfert s'accompagne d'extinction directe; dans le cas d'associations luminescentes il s'accompagne de l'apparition d'une luminescence sensibilisée des molécules associées au lieu d'une luminescence primaire (type II).

3. Extinction par absorption non active conditionnée par l'apparition de molécules associées non luminescentes dans la solution. Dans de telles solutions, l'absorption de la lumière excitatrice par la solution étant totale, la fraction de lumière absorbée par les monomères luminescents diminue, ce qui mène à une diminution du rendement de la luminescence (type III).

Les trois types d'extinction indiqués se développent inégalement avec l'augmentation de la concentration. Le développement du premier d'entre eux est déterminé principalement par la distance entre les molécules à l'état monomère, c'est-à-dire qu'il dépend *de la concentration absolue des monomères*. Le développement du deuxième est déterminé principalement par la distance des monomères aux dimères, c'est-à-dire qu'il dépend *de la concentration absolue des dimères*. Enfin le troisième type d'extintion dépend du rapport de l'absorption par les composants monomères et dimères de la solution, c'est-à-dire *des concentrations relatives et des coefficients d'absorption des monomères et des dimères*. On peut indiquer les indices caractéristiques suivants que doivent avoir les formes pures d'extinction énumérées ci-dessus :

comme nous l'avons déjà mentionné, il se produit presque toujours une intervention simultanée de toutes les formes d'extinction; c'est pourquoi la démonstration de l'existence de tel ou tel type d'extinction sur le fond commun du développement des trois processus exige l'application de l'ensemble de plusieurs indices. Pratiquement, tout d'abord on se convainc que les effets de concentration ne sont pas liés à une modification du pH du milieu; en premier lieu, parce que, par addition à volonté d'acide et d'alcali dans des solutions diluées on provoque une forte modification du pH de la solution et on établit l'indépendance des effets de concentration observés par rapport au pH du milieu. Puis on compare les changements d'intensité de la luminescence de solutions diluées et de solutions concentrées par élévation de température. La croissance de la luminescence des solutions concentrées par élévation de température, ou un ralentissement considérable de l'extinction par rapport à l'extinction de solutions diluées indique la présence dans les solutions concentrées aux basses températures de molécules associées extinctrices se dissociant lorsqu'on chauffe les solutions. Au contraire, une même variation de l'extinction par élévation de température dans des solutions concentrées et des solutions diluées indique l'absence de dimères et autres molécules associées dans les solutions concentrées. Lorsqu'il y a croissance de la luminescence et simultanément présence de molécules associées, dans le cas d'une faible concentration de ces molécules, leur rôle consiste en une capture de l'énergie excitatrice des monomères excités. Mais, si la quantité des molécules associées est considérable, il faut alors tenir compte aussi d'une

TABLEAU I

Indices caractéristiques des différents types d'extinction.

Indices d'extinction	1er type M → M	2e type M → D	3e type absorption non active
1. Spectres d'absorption	sans modification	se modifient lentement	se modifient fortement
2. Changement du rendement de la luminescence par élévation de la température. (Après correction pour l'extinction par élévation de température.)	sans modification (possibilité d'une petite diminution).	augmente	augmente
3. Modification du spectre d'absorption par élévation de température.	se modifie très faiblement	se modifie faiblement	se modifie fortement se rapprochant du spectre des monomères
4. Variation de l'extinction par changement de la longueur d'onde de la lumière d'excitation.	sans modification	se modifie faiblement	se modifie sensiblement
5. Durée de l'état excité.	diminue	diminue	sans modification
6. Degré de polarisation dans les solutions visqueuses.	diminue fortement	augmente lentement	sans modification

Il résulte de la confrontation des indices d'extinction du tableau I qu'aucun d'eux ne peut séparément établir certainement un type d'extinction. De plus,

absorption non active par elles d'une partie de l'énergie excitatrice. Dans le premier cas, par augmentation de la concentration les spectres d'absorp-

tion restent pratiquement inchangés; dans le second cas ils sont considérablement modifiés.

D'après la modification des spectres d'absorption dans certains cas, on peut déterminer les degrés d'association des solutions, puis opérer une séparation quantitative de l'extinction par migration et de l'extinction par absorption non active, et aussi établir la dépendance d'une probabilité d'un transfert par induction de l'énergie d'excitation à des associations extinctrices. Une détermination qualitative d'une action relative de l'extinction par migration des types I et II peut être faite sur la base d'une comparaison de la variation de l'extinction dans différents solvants favorisant ou défavorisant la formation d'associations.

Dans la présente communication, on traite de la séparation des types différents d'extinction qui a été opérée par :

1. Étude des spectres d'absorption.

2. Étude de la modification de l'intensité de la luminescence dans des conditions différentes d'observation.

3. Étude de l'action de la température sur le rendement de la luminescence et la forme des spectres d'absorption.

Nous examinons plus loin des exemples de développement de l'extinction dans des cas concrets et de séparation l'un de l'autre des différents types d'extinction.

Migration de l'énergie d'excitation dans des solutions aqueuses concentrées de matières colorantes. — On observe dans les solutions aqueuses concentrées de matières colorantes une grande déformation des spectres d'absorption et une forte croissance de l'intensité de l'émission par élévation de la température. Dans ses premiers travaux, un des auteurs (6) mettait ces deux effets exclusivement au compte d'une absorption non active. Th. FÖRSTER (15) se rangea à ce point de vue. Cependant, la variation de la durée de la luminescence se produisant par augmentation de la concentration indique l'existence d'une extinction par migration. C'est pourquoi dans (14) à côté de l'absorption non active il a été aussi introduit dans l'examen le processus de migration de l'énergie aux molécules associées non luminescentes. Dans le présent travail, ces processus ont pu être séparés l'un de l'autre.

La figure 2 présente les spectres d'absorption de solution aqueuse de rhodamine 6 G pour différentes concentrations allant de 1-4.10⁻⁶ à 4.10⁻³ m/l. Dans le domaine des petites concentrations jusqu'à 4.10⁻⁶ m/l. le spectre est constant, il caractérise l'absorption des monomères. L'augmentation ultérieure de la concentration mène à une diminution graduelle du maximum dû au monomère vers les grandes longueurs d'onde et à une croissance correspondante du second maximum dû au dimère vers les courtes longueurs d'onde. Dans le domaine ultraviolet, le spectre d'absorption est constant dans tout l'intervalle des concentrations étudiées.

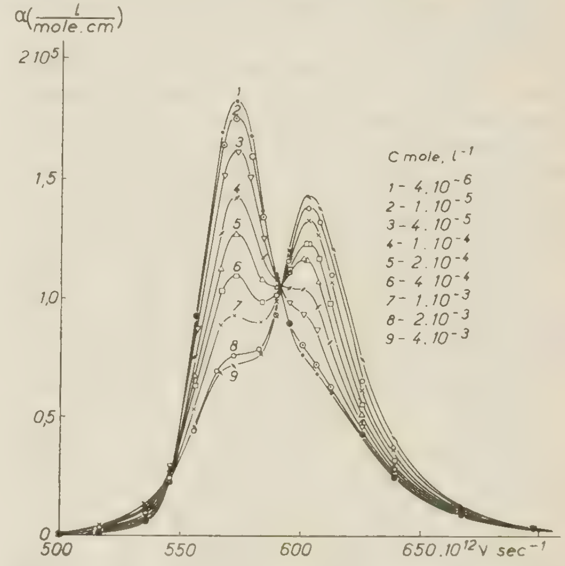


Fig. 2. — Spectres d'absorption de solutions aqueuses de rhodamine 6G. 1. 1-4.10⁻⁶, 2. 1.10⁻⁵, 3. 4.10⁻⁵, 4. 1.10⁻⁴, 5. 2.10⁻⁴, 6. 4.10⁻⁴, 7. 1.10⁻³, 8. 2.10⁻³, 9. 4.10⁻³ m/l.

Une propriété importante des spectres d'absorption des rhodamines dans le domaine visible est le passage de toutes les courbes d'absorption par un point; ainsi monomères et molécules associées possèdent dans une fréquence donnée une même absorption. Ceci peut avoir lieu soit à la condition que dans la solution il existe seulement des associations d'un seul genre (dimères), soit dans le cas où les associations supérieures conservent aussi dans une fréquence donnée l'absorption des dimères et des monomères (si par exemple les dimères entrent dans les associations supérieures comme parties composantes ne se perturbant par les unes des autres).

Pour la détermination de la fraction des monomères suivant les spectres d'absorption, nous partons des relations générales :

$$\alpha = \alpha_{mon}\, x + \alpha_{dim}\,(1 - x) \quad (1) \quad \text{et} \quad \frac{x^2}{1 - x} = \frac{D}{C} \quad (2)$$

où α, α_{mon} et α_{dim} sont respectivement les coefficients d'absorption expérimentaux des monomères et dimères, D est la constante d'équilibre, C la concentration.

De (1) et (2) il résulte que :

$$\frac{(\alpha - \alpha_{dim})^2}{\alpha_{mon} - \alpha} = \frac{D}{C}\,(\alpha_{mon} - \alpha_{dim}) \quad (3)$$

α_{mon} se mesure expérimentalement pour des concentrations tendant vers zéro. Dans l'équation (3) il reste alors deux inconnues : α_{dim} et D. Pour leur détermination, on emploie deux spectres d'absorption : à deux concentrations modérées pour lesquelles la formation d'associations supérieures est peu probable.

TABLEAU II

Modifications de l'association par augmentation de la concentration des rhodamines 6G et 3B en solutions aqueuses et développement de l'extinction par migration.

C mol/lit	Rhodamine 6G d'après absorp. x	$\mathfrak{J}/AC$	$\mathfrak{J}/AC\,x = \mathcal{K}_m \mathcal{K}_d = \mathcal{K}_d$	τ/τ_0	Rhodamine 3B d'après absorp. x	$\mathfrak{J}/AC$	$\mathfrak{J}/ACx = \mathcal{K}_m\mathcal{K}_d = \mathcal{K}_d$	τ/τ_0
4.10^{-6}	1	1	1	1	1	1	1	1
$1,10^{-5}$	0,95							
2.10^{-5}	0,92	0,90	1,0	1,0	0,98	1	1,02	1,0
4.10^{-5}	0,87	0,87	1,0	1,0	0,95	0,98	1.03	1,0
1.10^{-4}	0,72	0,74	1,02	1,0	0,90	0,91	1,01	1,0
2.10^{-4}	0,61	0,63	1,03	1,0	0,85	0,87	1,02	1,0
4.10^{-4}	0,50	0,52	1,04	0,8	0,74	0,76	1,02	0,93
1.10^{-3}	0,35	0,29	0,83	0,7	0,58	0,55	0,95	0,9
2.10^{-3}	0,26	0,17	0,65	0,6	0,46	0,33	0,72	0,8
4.10^{-3}	0,20	0,08	0,4	0,41	0,35	0,18	0,51	0,69
5.10^{-3}	0,18	0,05	0,3					
$7,5.10^{-3}$					0,28	0,08	0,29	
8.10^{-3}	0,14	0,02	0,14					

D'un tel système de deux équations de type (3), nous déduisons :

$$\alpha_{dim} = \frac{\alpha_1 - B\,\alpha_2}{1 - B} \; (4), \text{ où } B = \sqrt{\frac{C_2(\alpha_{mon} - \alpha_1)}{C_1(\alpha_{mon} - \alpha_2)}}$$

C_1 et C_2 sont des concentrations différentes, α_1 et α_2 sont les coefficients d'absorption leur correspondant. Puis connaissant α_{dim}, et employant (1) nous trouvons le degré d'association pour toutes les concentrations pour lesquelles la formation d'associations supérieures peut être négligée. Les valeurs trouvées des degrés d'association sont données dans le tableau II.

Le passage d'une partie considérable des molécules à l'état associé non luminescent s'accompagne de l'apparition d'une absorption non active, et en même temps de la diminution de l'intensité de la luminescence des solutions, ce dont il est indispensable de tenir compte lors de l'étude de la migration de l'énergie aux dimères.

L'intensité de luminescence d'une couche mince de solution est donnée par l'expression :

$$\mathfrak{J} = I\alpha\Delta C x \mathcal{K}_m \mathcal{K}_d \qquad (5)$$

Ici $\mathfrak{J}$ est l'intensité de luminescence observée, I l'intensité de la lumière excitatrice d'une longueur d'onde donnée, α le coefficient d'absorption, Δ l'épaisseur de la couche, C la concentration de la solution, x la fraction des molécules à l'état monomère, $\mathcal{K}_m$ le coefficient de l'extinction par suite de la migration de l'énergie sur les monomères, $\mathcal{K}_d$ le coefficient d'extinction par suite de migration de l'énergie sur les dimères. Plus loin le produit $I\alpha\Delta$ est désigné par A.

La courbe I (fig. 3) trouvée expérimentalement est la courbe de l'affaiblissement mentionné de l'intensité de la luminescence $\mathfrak{J}/AC$; la courbe II donne (tableau II) le cours de la diminution de la fraction des monomères luminescents x; la courbe III donne

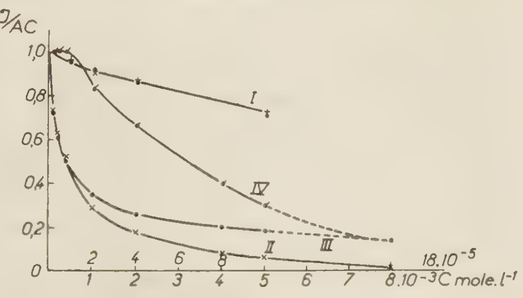


Fig. 3. *a* — Rapport d'intensité de la luminescence en fonction de la concentration dans des couches minces de solutions aqueuses de rhodamine 6G avec augmentation de la concentration de $C = 4.10^{-5}$ mole l^{-1} à $C = 1.10^{-4}$ mole l^{-1} (courbe I) et de $C = 4.10^{-5}$ mole l^{-1} à $C = 4.10^{-3}$ mole l^{-1} (courbe II); III et IV donnent respectivement la variation de l'extinction par absorption non active et par migration de l'énergie.

la variation de l'extinction par migration; les valeurs $\mathfrak{J}/ACx = \mathcal{K}_{mon}\,\mathcal{K}_{dim} = \mathcal{K}_{dim}$ sont réparties suivants les ordonnées de la courbe III. Nous voyons que les deux formes d'extinction : extinction par diminution du nombre des monomères luminescents et extinction par migration, donnent des effets de valeur comparable. En accord avec la théorie de la migration, l'extinction par migration amène une

modification de la durée de la luminescence, qui doit rester proportionnelle au rendement. Pour vérifier cette situation, on a fait des déterminations directes des durées de luminescence pour de nombreuses concentrations à l'aide du fluoromètre de L. A. Toumerman. Comme il ressort des valeurs τ/τ_0 insérées dans le tableau II, les durées moyennes de luminescence se modifient effectivement à peu près proportionnellement aux intensités de la luminescence, affaiblies par la migration de l'énergie d'excitation ($\tau/\tau_0 \cong \mathcal{K}_m \mathcal{K}_d$).

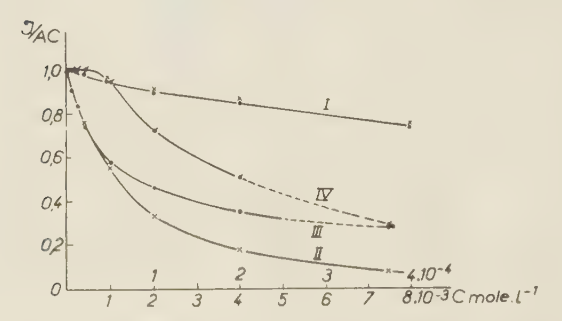


Fig. 3. *b* — Rapport d'intensité de la luminescence en fonction de la concentration dans des couches minces de solutions aqueuses de rhodamine 3B avec augmentation de la concentration : I) de $C = 2.10^{-6}$ à $C = 5.10^{-4}$ m/l; et II) de $C = 5.10^{-4}$ à $C = 1{,}5.10^{-2}$ m/l; III et IV donnent la variation de l'extinction par absorption non active et par migration de l'énergie respectivement.

Pour expliquer l'importance relative pour l'extinction des transferts d'énergie aux monomères et aux dimères $\mathcal{K}_{\text{mon}}$ $\mathcal{K}_{\text{dim}}$, remarquons ce qui suit. L'extinction par suite de transfert d'énergie devient apparente à des concentrations de molécules associées d'environ 3.10^{-3} m/l. ou des teneurs en dimères d'environ 3.10^{16} par cm³. Avec la même teneur en monomères, comme le montrent les expériences avec des solutions alcooliques, aucune extinction ne s'observe encore, elle commence seulement pour $C = 10^{-2}$ m/l. Par conséquent, l'interaction des monomères est incomparablement plus faible, et dans le domaine jusqu'à $C = 10^{-2}$ on peut poser $\mathcal{K}_{\text{mon}} = 1$. La raison en est en partie dans un moindre (environ 2 fois) recouvrement des spectres d'émission et d'absorption des monomères en comparaison avec le recouvrement des spectres d'émission des monomères avec les spectres d'absorption des dimères, à la suite de quoi le transfert de l'énergie des molécules aux dimères se produit plus souvent que de monomères à monomères dans des conditions identiques. Cependant, la cause principale est le peu de probabilité d'une extinction lors de tels transferts, ce qui découle de nombreuses données. Par exemple, dans les solutions visqueuses donnant une luminescence polarisée l'augmentation de la concentration amène une dépolarisation de la luminescence dans le domaine où l'extinction n'est pas encore développée.

La dépolarisation s'explique le plus simplement par des transferts de l'énergie de monomères à monomères ne s'accompagnant pas d'extinction. En présence des seuls transferts aux dimères dans les solutions concentrées, la polarisation doit s'accroître par suite de la diminution de la durée moyenne de l'état excité provoquée par l'extinction. Le peu de probabilité d'une extinction par migration de l'énergie de monomères à monomères pour des concentrations encore plus grandes se manifeste aussi dans les expériences sur l'effet de la température (voir ci-dessous).

Dans les solutions aqueuses de rhodamines, le caractère complexe de l'extinction est particulièrement bien marqué. Pour élucider le développement de types particuliers d'extinction des recherches furent faites sur des solutions où un seul type d'extinction prédominait.

Extinction du sulfate d'uranyle dans l'acide sulfurique. — Le sulfate d'uranyle dissous dans l'acide sulfurique possède de nombreuses propriétés remarquables. Présentons les caractéristiques des effets de concentrations suivant les travaux [16, 17].

La durée de la luminescence des solutions sulfuriques de sulfate d'uranyle est d'environ 10^{-4} sec. Par augmentation de la concentration de 0,14 à 0,74 g/cm³, le rendement de la luminescence diminue d'environ 3 fois. En chauffant les solutions on observe une diminution du rendement proportionnelle à la modification de la durée de la luminescence, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'indices de présence de molécules associées. Les spectres d'émission et les spectres d'absorption ne dépendent pas de la concentration. La modification de la durée de la luminescence par augmentation de la concentration reste aussi proportionnelle au rendement. La luminescence est complètement dépolarisée. Tous les indices indiqués correspondent à l'extinction par migration lors de transfert de l'énergie d'excitation de monomères à monomères. Si l'on estime qu'il s'agit d'un cas d'extinction par migration pure par transfert d'énergie aux monomères, alors cet exemple montre aussi que l'extinction lors de ces transferts est extrêmement peu probable. Dans les cristaux de sulfate d'uranyle et de nitrate d'uranyle la migration donne une extinction encore moindre; aux basses températures le rendement de la luminescence est proche de 1, malgré la présence d'une bande de résonance dans les spectres d'absorption et d'émission et autres conditions favorables à la migration.

Solutions de rhodamines 6G *et* 3B *dans l'alcool et dans la glycérine.* — L'alcool éthylique et la glycérine possèdent de nombreuses propriétés identiques, mais se différencient fortement par leur viscosité.

Ils dissolvent très bien les rhodamines. La concentration de matière colorante dans la solution peut être poussée jusqu'à 0,16 m/l. L'extinction visible commence pour des concentrations élevées (environ 10^{-2} m/l). Lorsqu'on chauffe les solutions concentrées éteintes, il se produit une croissance de la luminescence, ce qui montre clairement le rôle considérable des molécules associées dans ce processus (fig. 4 et 5). L'étude de l'absorption des solutions alcooliques montre le peu de changement des spectres d'absorption en comparaison avec ceux des solutions aqueuses. (fig. 6). Ainsi, dans les solutions alcooliques les molécules associées forment seulement une partie peu considérable du nombre total des molécules

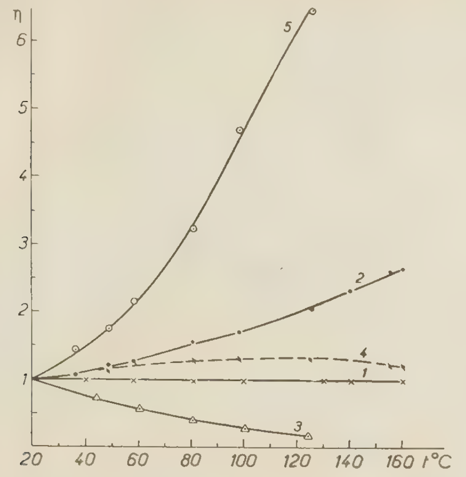


Fig. 4. — Dépendance à l'égard de la température du rendement de la luminescence de solutions alcooliques de rhodamine 3B, courbes 3, 4 et 5, et rhodamine 6G courbes 1 et 2 (λ d'excitation = 365 mμ). La courbe 5 est donnée après correction de l'extinction par effet de température. Courbes 1 et 3 : $C = 3.10^{-4}$ m/l; courbes 2, 4 et 5 : $C = 1{,}6.10^{-1}$ m/l.

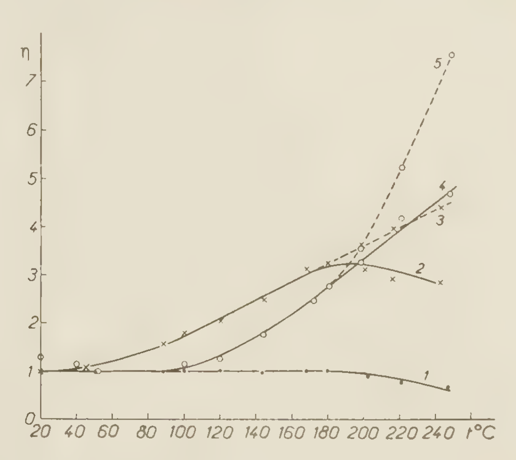
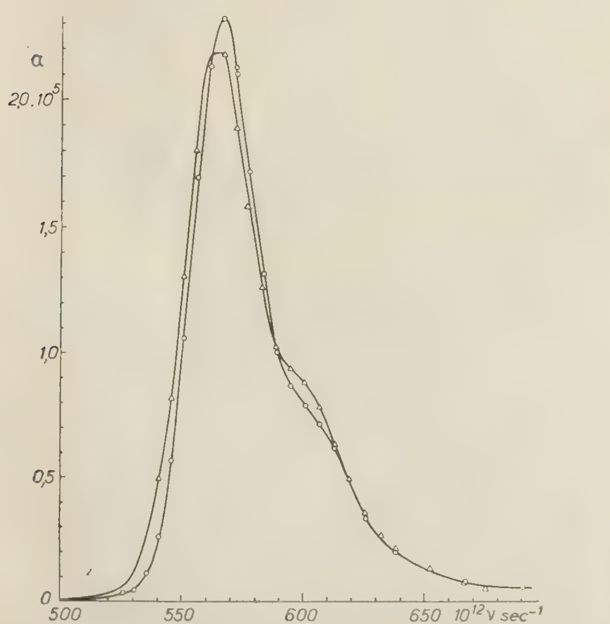


Fig. 5. — Dépendance à l'égard de la température du rendement de la luminescence de solutions dans la glycérine de rhodamine 6G. Les courbes ponctuées 3 et 5 sont données après correction de l'extinction par effet de température (λ d'excitation = 365 mμ). Courbe 1 : $C = 1.10^{-4}$; courbes 2 et 3 : $C = 2.10^{-2}$, courbes 4 et 5 : $C = 8{,}10^{-2}$ m/l.



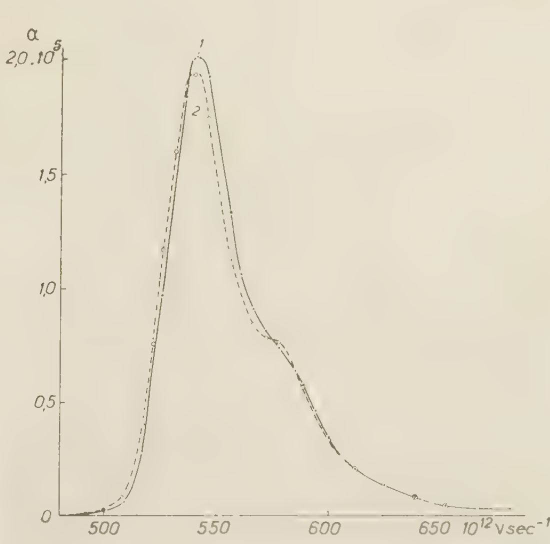


Fig. 6 *a*. — Spectre d'absorption d'une solution alcoolique de rhodamine 6G. Courbe 1 : $C = 4\ 10^{-5}$ m/l; courbe 2 : $C = 8{,}10^{-2}$ m/l.
6 *b*. — Spectre d'absorption d'une solution alcoolique de rhodamine 3B. Courbe 1 : $C = 2.10^{-6}$ m/l; courbe 2 : $C = 8.10^{-2}$ m/l.

en solution; c'est pourquoi l'action extinctrice de l'absorption non active ne peut être considérable. Comme il a été indiqué, jusqu'à une concentration de 10^{-2} m/l dans les solutions alcooliques aucune extinction n'est observée, et, par conséquent, la migration de monomères à monomères provoque une extinction tout à fait négligeable; l'absence de ce genre d'extinction est démontrée pour des concentrations encore plus grandes par la figure 4; par élévation de la température, le rendement de la luminescence des solutions de rhodamine 3B (C = 0,16 m/l), après correction pour l'extinction par effet de température, est comparable au rendement de la luminescence de solutions faibles. Cependant, la migration de monomères à monomères doit se produire, car les spectres d'absorption et d'émission se superposent l'un l'autre; la migration amène une dépolarisation de la luminescence des solutions dans la glycérine qui commence à apparaître déjà à la concentration de 10^{-4} m/l. Sur la base de ce qui vient d'être indiqué, on peut considérer les solutions alcooliques comme des solutions dans lesquelles se développe presque exclusivement l'extinction par migration sur les dimères.

Dans les solutions dans la glycérine, la modification du spectre d'absorption est, par augmentation de la concentration, plus grande (fig. 7). Avec C = 8.10^{-2} m/l, il y a déjà 46 % de molécules associées dans la solution (tableau III).

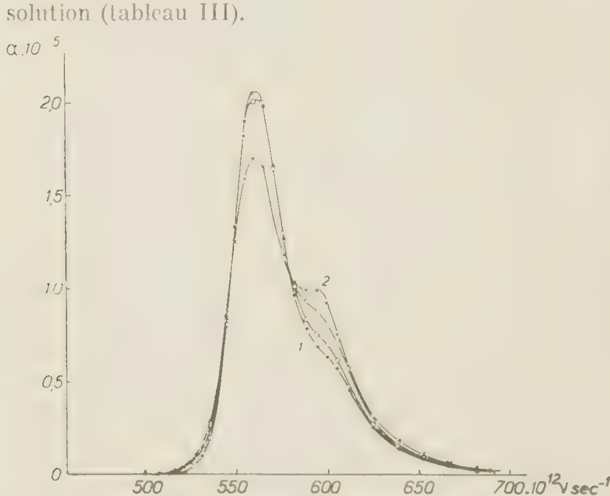


Fig. 7. — Spectre d'absorption de solutions dans la glycérine de rhodamine 6G. Courbe 1 : C = 1.10^{-5} m/l; courbe 2 : C = 2.10^{-3} m/l.

Des propriétés spécifiques de l'extinction des solutions dans l'alcool et la glycérine, il découle quelques déductions générales sur la cinétique de l'extinction par concentration. Jusqu'à 4.10^{-2} m/l, l'extinction se produit presque de même dans les solutions dans l'alcool et dans la glycérine. Cependant, la viscosité des solutions dans la glycérine dépasse de 300 fois la viscosité des solutions alcooliques. Il est ainsi clair que l'extinction n'est pas liée à la diffusion des molécules mêmes des matières colorantes. L'indépendance de l'extinction à l'égard de la viscosité a déjà été soulignée par un des auteurs dans [5].

Il est également intéressant de se demander si le transfert de l'énergie d'un monomère excité à un dimère est direct, ou si le transfert s'effectue par voie de nombreux transferts intermédiaires à des monomères? Cette dernière possibilité est probable, étant donné qu'un monomère ayant reçu de l'énergie d'un autre monomère ne perd pas la possibilité de la transmettre ensuite à un dimère; néanmoins de tels processus jouent évidemment un rôle secondaire. En effet, déjà avec un seul transfert d'énergie aux monomères voisins il doit se produire une dépolarisation presque complète de la luminescence [18]. Cependant, même avec des degrés considérables d'extinction la luminescence ne se dépolarise pas complètement. Par augmentation de la concentration, après une rapide diminution initiale du degré de polarisation, la dimunition se produit ensuite assez lentement [19, 20, 21], par suite de la diminution de la durée moyenne de la luminescence, et, par conséquent, d'une moindre probabilité d'une dépolarisation par mouvement brownien et par migration de l'énergie aux monomères voisins. En tout cas, l'existence d'une polarisation montre qu'une partie seulement des molécules parvient à transmettre son énergie aux monomères voisins avant l'émission (et, par conséquent avant l'extinction). Il ne peut être question de migrations prolongées de l'énergie d'excitation et de transferts réitérés de monomères à monomères allant d'une molécule radiante à une molécule extinctrice lorsque la polarisation est considérable.

Par suite d'une bonne solubilité des matières colorantes dans les alcools et une très grande concentration globale des solutions concentrées, même un petit pourcentage de molécules associées correspond à une concentration absolue considérable de ces molécules associées.

TABLEAU III

Degrés d'association et d'extinction par augmentation de la concentration de la rhodamine 6G en solution dans la glycérine.

Solutions dans la glycérine

Cm/l	1 — x	Cm/l	Ng/cm³
1.10^{-4}	0		
1.10^{-2}	0,03	3.10^{-4}	$0,9.10^{17}$
2.10^{-2}	0,08	$1,6.10^{-3}$	$4,8.10^{17}$
4.10^{-2}	0,11	$4,4.10^{-3}$	$1,3.10^{18}$
8.10^{-2}	0,46	$3,68.10^{-2}$	$1,1.10^{19}$

Le tableau III, pour des solutions dans la glycérine, donne les fractions approximatives des molécules associées en fonction de la concentration (1 — x),

TABLEAU IV

Association $(1 - x)$ *de rhodamine* 6G *dans une solution électrolytique* (H_2O + 5 % NaCl).

Solvant	Méthode de détermination	4.10⁻⁶	1.10⁻⁵	2.10⁻⁵	4.10⁻⁵	1.10⁻⁴
H_2O + 5 % NaCl	$(1 - x)$ d'après absorption	0,08	0,14	0,22	0,33	0,46
	d'après luminescence	—	—	0,21	0,28	0,44

déterminées par comparaison des formes des spectres d'absorption des solutions dans la glycérine avec les spectres des solutions aqueuses; le tableau III donne aussi la concentration en dimère m/l et le nombre des particules Ng dimères par cm³.

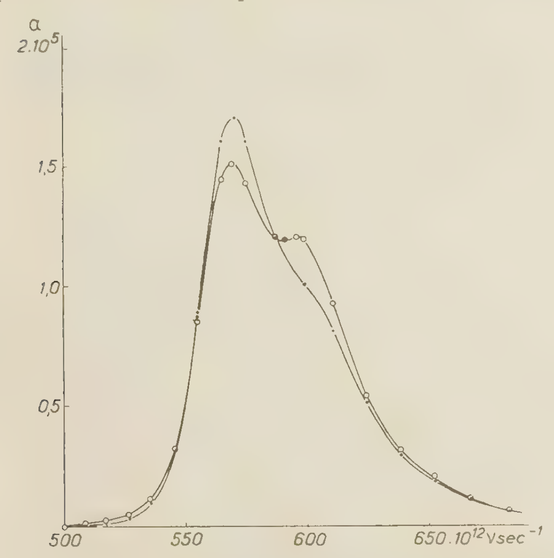


Fig. 8. — Modification du spectre d'absorption d'une solution aqueuse de rhodamine 6G. C = 4.10^{-5} m/l. 1° dans l'eau; 2° dans l'eau + 5 % NaCl.

Phénomène d'extinction par concentration de matières colorantes dans des solutions électrolytiques. — Le phénomène d'extinction par concentration conditionné par le développement d'une absorption non active se manifeste dans une forme plus pure quand l'association se produit déjà pour de très petites concentrations. En ce cas, le pourcentage des molécules associées sera grand, mais leur teneur absolue peu considérable; c'est pourquoi il doit y avoir de fortes modifications du spectre d'absorption, et par suite une forte extinction par absorption non active, mais les distances moyennes entre les particules associées seront tellement considérables que la migration aux dimères ne se développe presque pas. Un tel tableau doit s'observer chez les matières colorantes dans les solutions électrolytiques. Nous avons procédé à des expériences avec la rhodamine 6G dans (H_2O + 5 % NaCl). Fig. 8, tableau IV.

Du tableau IV, il ressort que les degrés d'association dans les solutions électrolytiques, déterminés suivant les déformations des spectres d'absorption et suivant la diminution de l'intensité de la luminescence des solutions, sont égaux. Il s'ensuit que l'extinction de la luminescence aux faibles concentrations de la matière colorante dans les solutions électrolytiques est conditionnée par le développement de l'absorption non active.

BIBLIOGRAPHIE

(1) J. Perrin et Mlle Choucroun. — 1929, **189**, 1213.

(2) V. L. Ermolaev et A. I. Térénine. — *En mémoire de S. I. Vavilov, recueil de l'Acad. des Sc. de l'U.R.S.S.*, Moscou;
N. A. Prilejaeva. — *Acta physicochim. U.R.S.S.*, 1935, **15**, 785.

(3) N. D. Jevandrov. — *Comp. rend. Acd. des Sc. de l'U.R.S.S.*, 1955, **100**, 455.

(4) F. Stenger. — *Wied. Ann.*, 1886, **28**, 316.

(5) B. Walter. — *Wied. Ann.*, 1889, **34**, 316.

(6) V. L. Levchine. — *Zs. f. Phys.*, 1927, **43**, 230.

(7) J. Perrin. — 2e *conseil de chim. Solvay*, Paris 1925, p. 322; *C. R.*, 1927, **184**, 1097.

(8) F. Perrin. — *Ann. de Phys.*, 1932, **17**, 283.

(9) S. I. Vavilov. — JETF., 1943, **13**.

(10) M. D. Galanine. — JETF, 1955, **28**, 485.

(11) V. L. Levchine. — *Rev. Phys., Chim.*, 1935, **6**, 1.

(12) F. Perrin. — *C. R.*, 1931, **192**, 1727.

(13) F. Douchinsky. — *Compt. rend. Acad. des Sc. de l'U.R.S.S.*, 1937, **14**, 73, 179.

(14) V. L. Levchine. — *Izvestia Acad. des Sc. de l'U.R.S.S., série physique*, 1956, **20**, 397.

(15) Th. Förster. — *Naturwissench.*, n° 173, 1946, **33**, 166; *Ann. d. Phys.*, 1947, **2**, 55; *Fluoreszanz organischer Verbindungen*, Göttingen 1951.

(16) S. I. Vavilov et V. L. Levchine. — *Zs. f. Phys.*, 1928, **48**, 397.

(17) V. L. Levchine. — *Izvestia Acad. des Sc. de l'U.R.S.S., série physique*, 1937, **2**, 185; *Acta physicochim., U.R.S.S.*, 1937, **5**, 61.

(18) M. D. Galanine. — *Trav. Inst. Phys. Ac. des Sc. de l'U.R.S.S.*, 1950, **5**, 339.

(19) V. L. Levchine. — *Zs. f. Phys.*, 1924, **26**, 274.

(20) S. I. Vavilov. — *Zs. f. Phys.*, 1925, **31**, 750.

(21) P. P. Feofilov et B. I. Svechnikov. — *Jour. of. Phys., U.R.S.S.*, 1940, **3**, 493.

TRANSFERT D'ÉNERGIE DANS LA DIHYDRO-DIPHOSPHOPYRIDINE NUCLÉOTIDE

par Gregorio WEBER.

[*Department of Biochemistry, University of Sheffield.*]

Traduit par Mme J. Cyrot.

SOMMAIRE

Des mesures de spectres d'absorption, de spectres de fluorescence et de spectres d'excitation de fluorescence de solutions de dihydro-diphosphopyridine nucléotide (DPNH) et de 4-hydro N-méthyl nicotinamide (HNM) montrent qu'il y a une forte interaction entre les parties adénine et nicotinamide du DPNH. Des mesures de polarisation de fluorescence indiquent que le temps de relaxation rotationnelle du DPNH en solution est à peu près six fois plus grand que celui du HNM, ce qui prouve que la molécule de DPNH subit une rotation d'ensemble, comme on pourrait s'y attendre s'il y avait un complexe entre l'adénine et la nicotinamide. Le temps de relaxation rotationnelle du HNM augmente aussi de 60 % dans des solutions concentrées de caféine ou d'adénosine. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus avec la flavine adénine dinucléotide, pour laquelle des études antérieures ont montré l'existence d'un complexe intramoléculaire. Des mesures d'excitation de la fluorescence montrent que l'énergie absorbée par l'adénine dans le DPNH peut apparaître comme fluorescence de la nicotinamide avec un rendement en photon d'environ 30 %. Les effets des modifications spectrales et ceux du transfert d'énergie sont discutés en relation avec la structure du DPNH en solution et l'interaction des bases purine dans les acides nucléiques.

Méthodes expérimentales.

Les spectres d'absorption ont été obtenus avec un spectrophotomètre à prisme Uvispek. Les spectres d'excitation de fluorescence et les spectres de fluorescence ont été enregistrés de la façon déjà décrite ([1, 2]). Les rendements quantiques absolus de fluorescence ont été déterminés par la méthode de Weber et Teale ([3]). La polarisation de la fluorescence excitée par une radiation Hg 366 mμ a été obtenue avec l'appareil décrit par Weber ([4]). La précision absolue des mesures était $\Delta p = \pm 0{,}001$. Pour les mesures avec excitation par une radiation Hg 254 mμ, la méthode précédente ne convient pas en raison de l'opacité des polariseurs à une radiation de longueur d'onde plus courte que 300 mμ et la nécessité d'utiliser une source ponctuelle de forte intensité. Dans ce cas on a utilisé une méthode décrite par Hall ([5]). La figure 1 montre un diagramme de l'ensemble de l'appareil. Le courant photoélectrique est amplifié

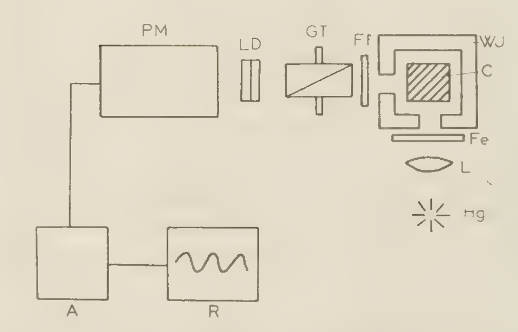


Fig. 1. — Appareil utilisé pour la détermination de la polarisation de fluorescence excitée par Hg 254 mμ.
Hg : arc à mercure à basse pression;
L : lentille de quartz;
Fe : filtre pour isoler la radiation 254 mμ (Chance OX7);
WJ : chemise d'eau pour maintenir la solution dans C à température constante.
Ff : filtre de fluorescence (Chance OY12);
Gt : prisme Glan-Thomson;
LD : dépolariseur Lyot.
PM : photomultiplicateur RCA 6217 avec amplifieur A et enregistreur R.

est enregistré en faisant tourner lentement un prisme Glan-Thomson entre la source fluorescente et le photomultiplicateur. L'excitation est faite au moyen d'un arc à mercure à basse pression suivi d'un filtre Chance OX7. Un dépolariseur Lyot ([6]) est interposé entre le photomultiplicateur et le prisme polarisant pour rendre la réponse du prisme indépendante du plan de polarisation de la fluorescence. L'enregistreur donne des maxima et des minima quand on fait tourner le polariseur à la vitesse de 1°

par seconde. On peut calculer à partir de ces tracés le signe et la grandeur de la polarisation. Il n'est pas facile de détecter par cette méthode des polarisations inférieures à 1 %, car sa précision est de l'ordre de $\Delta p = 0{,}005$. Le même dispositif a été utilisé pour les mesures de variation du rendement de fluorescence avec la température, mais on a retiré le polariseur rotatif. La température était contrôlée grâce à une chemise d'eau d'un bain contrôlé à ± 0,05 °C.

Substances employées.

On a toujours utilisé de la dihydro-diphosphopyridine nucléotide Sigma. La 4-hydro N-méthyl Nicotinamide [7, 8] était préparée par réduction d'iodure de N-méthyl nicotinamide avec de la dithionite en atmosphère d'azote à 0 °C, en présence d'un excès de carbonate de sodium. Après avoir reposé pendant une heure, la solution était extraite au chloroforme. L'extrait au chloroforme était ensuite agité avec un volume égal d'un tampon 0,1 M tris (hydroxy-méthyl)-amino-méthane de pH 8,3. Le composé n'a jamais été isolé à l'état solide car l'on sait qu'au cours de cette préparation il se produit une décomposition partielle [7], ce qui est révélé par l'apparition d'une substance non-fluorescente ayant un maximum d'absorption à 295 mμ, longueur d'onde à laquelle HNM présente un minimum réel. On s'assure de la pureté spectroscopique des solutions de HNM préparées de la façon décrite grâce à l'identité des spectres d'absorption fractionnelle et des spectres d'excitation de la fluorescence, tels qu'ils sont définis par WEBER et TEALE [2]. Par titrage oxydant avec du ferrocyanure de potassium on a trouvé un coefficient d'absorption molaire à 360 mμ égal à 7 500, qui est à comparer avec la valeur de 7 000 donnée par RAFTER [9]. Notre valeur a été utilisée pour déterminer dans chaque cas la concentration de HNM en solution. Les solutions de HNM sont instables. En étudiant la disparition de la bande d'absorption à 360 mμ et son remplacement par une absorption accrue à 295 mμ, on a trouvé que la demi-durée de vie de la substance variait avec le pH d'une façon qui est indiquée dans le tableau I. Il est évident qu'à pH 8-9 tout procédé expérimental exigeant quelques heures ne pourra être utilisé sans crainte d'une décomposition partielle. Les solutions de HNM étaient conservées à 4 °C. On n'utilisait pas de solutions plus vieilles que de 24 h. Lorsqu'on préparait des solutions diluées de HNM pour la mesure du rendement de fluorescence dans différents solvants, on mélangeait un petit volume de solution concentrée dans le chloroforme ou l'eau avec le solvant qu'on désirait étudier. La teneur en chloroforme ou eau dans le mélange final était inférieure à 3 %.

TABLEAU I

Stabilité de HNM *en solution aqueuse à 18* °C.

Solutions tampons au phosphate 0,1M.

pH	Demi-durée de vie
6	2 mn
7	10 —
6,5	6 —
7	12 —
7,5	26 —

Solutions tampons au tris (hydroxyméthyl) amino-méthane 0,1 M.

pH	demi-durée de vie
6	9 mn
7	19 —
8	400 —
8,4	> 5 jours

Le nucléotide pyrophosphatase était préparé par la méthode de KORNBERG et PRICER [10]. La flavine mononucléotide et la flavine adénine spectroscopiquement pures étaient un cadeau du Pr K. YAGI.

Spectres d'absorption.

La figure 2 représente les spectres d'absorption de solutions de DPNH de concentration égale. Les

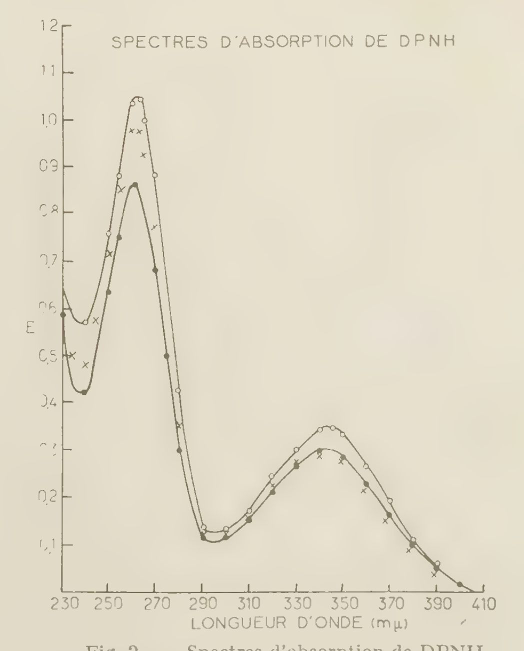


Fig. 2. — Spectres d'absorption de DPNH.
● —— ● solution aqueuse;
× —— × la même après incubation d'une heure à 38 °C avec la nucléotide pyrophosphatase;
○ —— ○ solution de propylène glycol.

spectres sont ceux des solutions dans l'eau (points), le propylène glycol à 95 % (cercles) et l'eau après action de nucléotide pyrophosphatase (croix). A titre de comparaison nous avons montré sur la figure 3 les spectres d'absorption de la flavine adénine dinucléotide (FAD) obtenus dans des conditions identiques. Les modifications les plus intéressantes sont celles obtenues dans la bande de 260 mμ, région du spectre où les deux anneaux aromatiques de chaque molécule ont une absorption appréciable. Un traitement avec de la nucléotide pyrophosphatase augmente l'absorption au maximum de 260 mμ d'environ 16 % dans DPNH et de 17 % dans FAD. Les solutions dans le propylène glycol présentent respectivement des accroissements relatifs de 20 % et 22 % par rapport à l'absorption dans l'eau. Il faut souligner que l'acide adénylique ne présente pas de modification appréciable d'absorption lorsqu'il est dissous dans le propylène glycol, si bien qu'on ne peut attribuer la modification à une action du solvant seul. Whitby [11] a aussi fait remarquer que l'absorption de FAD dans la région de 260 mμ était environ 30 % inférieure à la somme des absorptions des composants adénine et isoalloxazine. Les modifications dans les bandes de FAD à 375 mμ et 450 mμ semblent à associer [12] à l'existence d'un complexe intramoléculaire dans FAD entre l'isoalloxazine et l'adénine. Des preuves que nous indiquons plus loin dans cet article montrent que c'est aussi le cas pour DPNH.

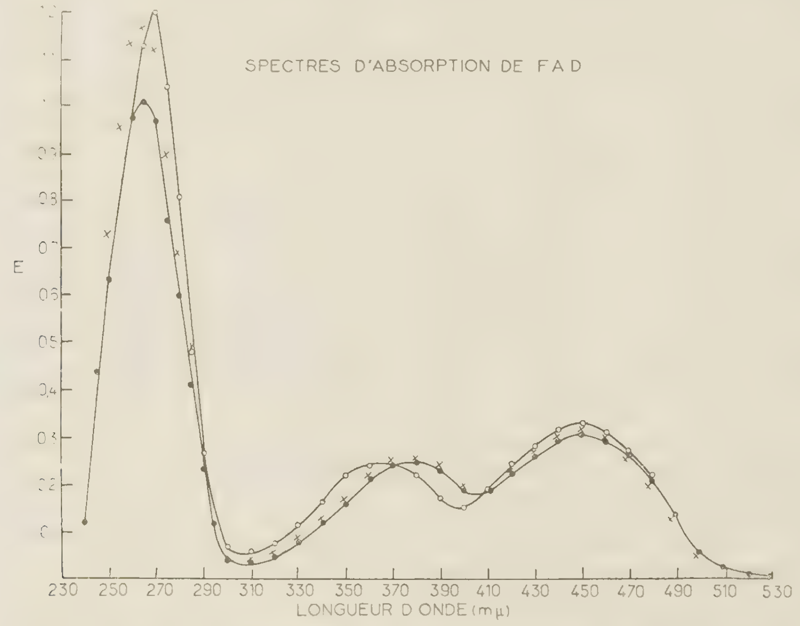


Fig. 3. — Spectres d'absorption de FAD. Mêmes conventions que sur la figure 2.

La diminution d'absorption et l'élargissement à 260 mμ peuvent s'expliquer comme le résultat d'une association spatiale intime de deux structures absorbant dans la même région spectrale. L'élargissement observé est l'analogue du dédoublement de Davidov. La diminution d'absorption peut s'expliquer si les oscillateurs responsables de l'absorption par les deux anneaux sont approximativement parallèles et les moments dipolaires associés aux transitions opposés l'un à l'autre.

Spectres d'excitation de fluorescence.

Ils sont donnés sur la figure 4 et ont aussi été discutés ailleurs [13]. Ils montrent que la lumière absorbée par la partie adénine dans le DPNH est suivie de l'émission de fluorescence de la partie nicotinamide. Le rendement de transfert à la nicotinamide de l'énergie électronique absorbée par l'adénine est défini par :

$$\frac{\text{quanta absorbés par l'adénine}}{\text{quanta émis par la nicotinamide}} \cdot \frac{1}{q}$$

où q est le rendement quantique de fluorescence observé par excitation de la partie nicotinamide seule. A partir du spectre d'excitation de fluorescence, on trouve que le rendement de transfert est voisin de 30 % dans les solutions intactes de

DPNH à pH 7 à 9. Toutes les preuves de transfert disparaissent dans des solutions de DPNH incubées

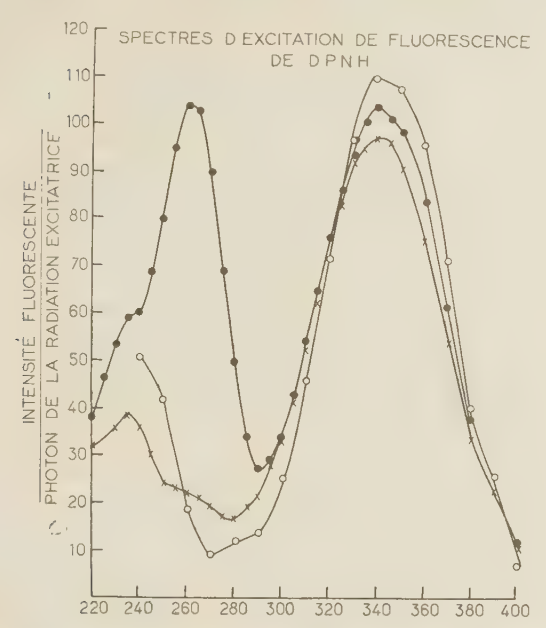


Fig. 4. — Spectres d'excitation de fluorescence de DPNH. Mêmes conventions que sur la figure 2.

avec de la nucléotide pyrophosphatase pendant une heure à 38 °C, ou simplement en dissolvant le DPNH intact dans le propylène glycol.

TABLEAU II

Emission de Fluorescence et rendement quantique de solutions de HNM *et* DPNH *à 18* °C.

Solvant de HNM	λ_{max}	$\lambda_{-\frac{1}{2}}$	$\lambda_{\frac{1}{2}}$	$\Delta\nu \times 10^3$ (cm^{-1})	9×10^2
Tampon pH 8,3	468	434	523	3,92	2,1
Méthanol............	452	419	502	3,95	5,6
Ethanol	451	419	499	3,80	5,5
Acétate d'éthyle	439	405	480	3,86	2,3
Chloroforme	440	412	490	3,87	5,3
Diméthylformamide ..	443	409	485	3,73	3,4
Solvant de DPHN					
Tampon pH 8,3	457	419	507	4,14	2,9
le même après nucléotide pyrophosphatase	456	415	505	4,2	2,8

Les valeurs de q les unes par rapport aux autres sont correctes à ± 3 % près. Comme valeurs absolues, leur précision est de ± 10 %.

λ_{max} est le maximum de fluorescence en mμ. $\lambda_{\frac{1}{2}}$ et $\lambda_{-\frac{1}{2}}$ sont les longueurs d'onde auxquelles l'émission a la valeur moitié du maximum. La quatrième colonne du tableau donne la largeur de bande en nombres d'onde.

Spectres de fluorescence.

Ils consistent en une seule bande qui est approximativement l'image réfléchie dans un miroir de la bande d'absorption de moindre fréquence correspondant aux distributions de Gauss avec déviations standard d'environ 2 000 cm^{-1}.

Le tableau 2 donne les résultats obtenus pour le spectre de fluorescence de HNM dans différents solvants et de DPNH avant et après traitement avec la nucléotide pyrophosphatase. Le spectre d'absorption de HNM ne subit pas de modifications appréciables si bien que les grands changements de la position du maximum de fluorescence indiquent un moment dipolaire accru à l'état excité. L'application d'une équation due à Lippert (14) donne 6 D pour la différence des moments dipolaires entre l'état fondamental et l'état excité. Cela est, sans aucun doute, dû à une contribution accrue de la structure I à l'état excité.

(I)

(II)

Ainsi la bande d'absorption de 360 mμ peut être imputée à une transition n-π^*. La plus grande partie de la différence constatée dans les spectres de fluorescence et les spectres d'absorption de DPNH et HNM est attribuable à des différences entre les composés N-méthyl et N-ribose, puisque le spectre de fluorescence de DPNH ne subit qu'une modification mineure après action de la nucléotide pyrophosphatase. Le déplacement de l'absorption de 360 mμ (dans HNM) à 340 mμ (dans DPNH) et celui de la fluorescence de 468 à 456 mμ peut se comprendre si, dans le composé N-ribose, il y a contribution de la structure II à l'état fondamental.

Rendements quantiques de fluorescence.

Ils sont donnés dans le tableau II. Pour la détermination du rendement quantique on a utilisé le glycogène comme standard de rendement quantique unité. Une comparaison directe entre le standard glycogène et une solution fluorescente de rendement

2 à 3 % est difficile car la lumière excitatrice parasite devient alors une fraction importante de la lumière fluorescente elle-même. Les résultats obtenus avec le standard glycogène ont donc été vérifiés en comparant l'émission de fluorescence à partir de DPNH et de HNM avec celle d'une solution de 1-diméthylamino-naphtalène-7 sulfonate de sodium qui a un rendement quantique de 0,75. Son maximum de fluorescence en solution aqueuse est de 478 mμ avec une largeur de bande de 4 120 cm^{-1}. Lorsque l'émission totale de cette substance ou des nicotinamides réduites est examinée par un photomultiplicateur RCA 6217 les courants photoélectriques sont proportionnels à l'émission totale, sans erreur importante pourvu que toute la lumière excitatrice soit éliminée. Cette lumière était une radiation pure Hg 366 et a été éliminée par une couche de 3 mm de de 2M $NaNO_2$ placée entre la solution fluorescente et le photomultiplicateur.

Des mesures antérieures de spectre de fluorescence des solutions indiquaient que le filtre ne donnait aucune perte importante de la lumière fluorescente, excepté celle provenant de la réflexion.

Le rendement de fluorescence de HNM à 40 °C était 40 % inférieur à celui à 2 °C, tandis que celui de DPNH était 50 % inférieur. En se référant à la figure 5 on peut comprendre cette variation du rendement avec la température. Soit μ_0 la probabilité de

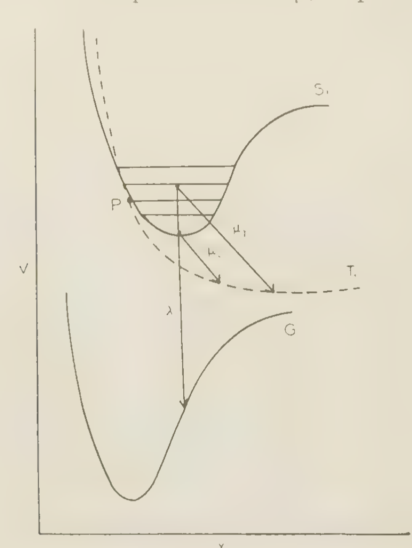


Fig. 5. — Diagramme d'énergie potentielle pour montrer la dépendance du rendement quantique avec la température.

transition de l'état fluorescent à l'état de triplet pour les niveaux d'énergie inférieurs au point d'intersection p et μ_v pour les niveaux d'énergie supérieurs à ce point, soit λ la probabilité de transition de l'émission de chaque niveau. A chaque température t, le rendement obtenu est

$$q(t) = \frac{\lambda}{\lambda + \mu_0 \frac{n_0}{n} + \mu_v \frac{n_v}{n}} \quad (1)$$

où n_0/n est la fraction de population pour tous les niveaux au-dessous de l'intersection et n_v/n la fraction de population pour tous les niveaux au-dessus de l'intersection. On a donc $n_0/n = \mathrm{I} - \exp.(-\mathrm{E/RT})$ et $n_v/n = \exp.(-\mathrm{E/RT})$ dans lequel E est l'énergie de l'intersection rapportée au niveau zéro de l'état fluorescent. On obtient alors

$$q(t) = \frac{\lambda}{\lambda + \mu_0 + (\mu_v - \mu_0)e^{-\mathrm{E/RT}}} \quad (2)$$

$$\log\left\{\frac{\mathrm{I}}{q(t)} - \frac{\mathrm{I}}{q_0}\right\} = \log\left\{\frac{\mu_v - \mu_0}{\lambda}\right\} - \frac{\mathrm{E}}{2{,}3\mathrm{RT}} \quad (3)$$

relation dans laquelle on fait la substitution

$$q_0 = \lambda/\lambda_0 + \mu_0.$$

La dernière équation permet de calculer E à partir d'une courbe d'Arrhénius, à condition que l'on connaisse q_0. Cette dernière valeur a été déterminée de façon approchée par comparaison des rendements de fluorescence de solutions de DPNH (et HNM) dans le propylène glycol à 2 °C et — 70 °C. Le rapport des rendements était de 0,815, valeur suffisamment élevée pour indiquer que la contribution en excès des molécules excitées thermiquement à la transition

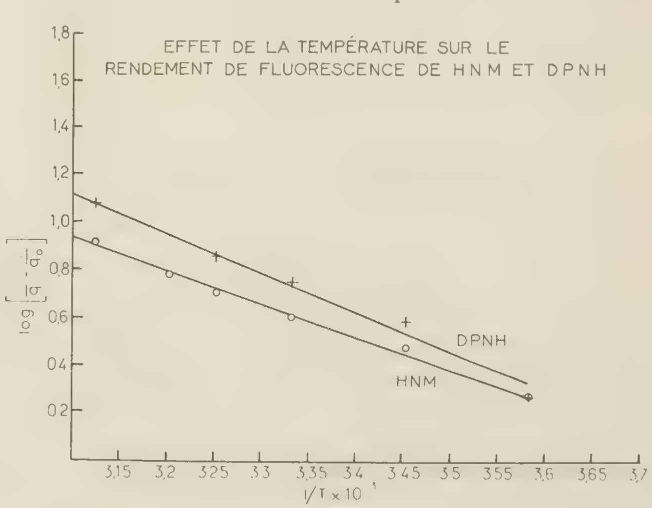


Fig. 6. — Courbes d'Arrhenius (équation 3) pour la modification de la fluorescence de HNM et DPNH avec la température.

$S_I - T_I$ était très faible à la température plus basse, si bien qu'à — 70 °C on pouvait considérer le rendement comme égal à q_0. C'est en utilisant cette valeur de q_0 qu'on a représenté sur la figure 6 les courbes d'Arrhénius pour les deux substances. On a trouvé

que pour le DPNH E était égal à 2,8 kcal et pour HNM 2,5 kcal; il semble donc que l'élévation au premier niveau vibrationnel augmente de façon appréciable la probabilité de transition à l'état de triplet.

Durée de vie de l'état excité.

La durée de vie naturelle de la radiation τ_n peut être calculée d'après la force de l'oscillateur de la bande de moindre fréquence ([15]); l'équation de FÖRSTER ([16]) à cet effet est :

$$\frac{1}{\tau_n} \simeq 2{,}88 \times 10^{-9} n^2 \nu_a \int_0^\infty \varepsilon(\nu) d\nu \qquad (4)$$

où n est l'indice de réfraction du solvant, ε le coefficient d'absorption molaire est ν_a le nombre d'onde du maximum d'absorption. En assimilant la bande d'absorption à une courbe de Gauss de maximum ε_0 et de déviation standard σ, de sorte que $\varepsilon = \varepsilon_0 \exp\left(-\frac{(\nu - \nu_a)^2}{\sigma^2}\right)$, la dernière équation donne

$$\frac{1}{\tau_n} = 2{,}88 \times 10^{-9} n^2 \nu_a \varepsilon_0 \sigma \sqrt{\pi} \qquad (5)$$

pour HNM et DPNH en solution aqueuse ($n^2 = 1{,}78$),

	ν_a(cm^{-1})	ε_0(cm^2/mMol)	σ(cm^{-1})	$\tau_n \times 10^9$ sec.
	—	—	—	–
HNM ...	27 780	7 500	2 240	8,6
DPNH ..	29 410	6 220	1 740	11,8

Il ne faut pas perdre de vue le caractère approximatif de cette équation. La durée de vie réelle est $\tau = q \cdot \tau_n$ si, et seulement si, tous les processus qui réduisent le rendement de fluorescence sont en compétition avec l'émission. En introduisant les valeurs de q contenues dans le tableau II, les durées de vie réelles sont 1,7 10^{-10} sec. pour HNM et 3,4 10^{-10} sec. pour DPNH.

Polarisation de la fluorescence.

L'absorption de la radiation Hg 366 mμ par le DPNH a pour résultat l'excitation de la moitié nicotinamide seule. Donc les polarisations observées dans les solutions de DPNH et HNM par excitation avec Hg 366 sont directement comparables. La figure 7 montre la courbe de l'inverse de la polarisation linéaire (I/p) en fonction de la température absolue/viscosité pour l'eau (T/η). Les valeurs reliées par les lignes pointillées sont les valeurs observées expérimentalement non corrigées pour la variation de la fluorescence avec la température. On peut appliquer cette correction en supposant que l'effet de la température est compétitif avec l'émission, auquel cas

$$I_t / I_0 = \tau_t / \tau_0 \qquad (6)$$

Dans cette dernière équation I_t et I_0 sont les rendements de fluorescence obtenus respectivement à température t et à une température de référence t_0 arbitrairement choisie et τ_t et τ_0 les durées de vie

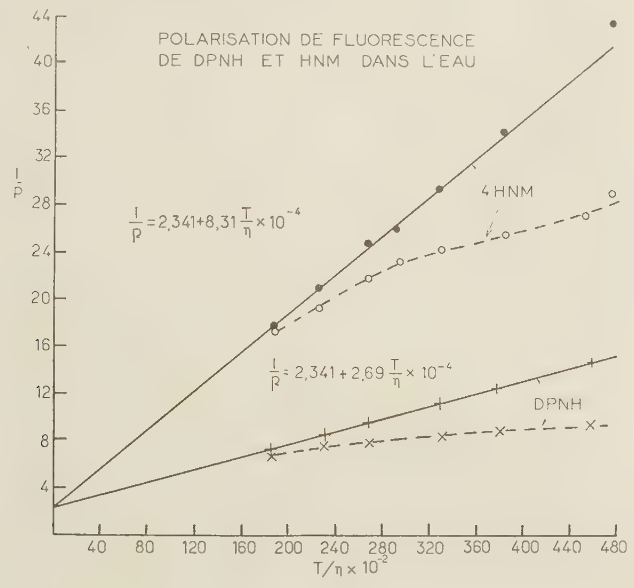


Fig. 7. — Polarisation de la fluorescence de DPNH et HNM dans l'eau à différentes températures (équation 8).

correspondantes de l'état excité. La loi de PERRIN de dépolarisation isotropique (17) donne

$$\left(\frac{1}{p} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3}\right)\left(1 + \frac{RT}{\eta V}\tau_t\right) \quad (7)$$

où p_0 est la polarisation pseudoprincipale (18) obtenue lorsque $\frac{RT}{\eta V}\tau_t \to 0$, R la constante de gaz et V un volume moléculaire efficace. La polarisation p_c corrigée pour le changement de durée de vie avec la température est donnée par

$$\left(\frac{1}{p_c} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3}\right)\left(1 + \frac{RT}{\eta V}\tau_0\right) \quad (8)$$

Les trois dernières équations donnent

$$\frac{1}{p_c} = \frac{1}{p_0} + \left(\frac{1}{p} - \frac{1}{p_0}\right)\frac{I_0}{I_t} \quad (9)$$

Pour appliquer la correction, il faut la valeur de p_0. Elle a été obtenue par mesure directe de la polarisation de solutions dans le glycérol de HNM et DPNH, observée à 3 °C; on a trouvé qu'elle était égale à 0,421 ± 0,001 pour les deux substances. En introduisant $I/p_0 = 2{,}431$ et les valeurs de I/I_0 (I_0 = rendement de fluorescence à 2 °C) figurant sur la figure 6, les points tombent en ligne droite qui s'extrapole jusqu'à la valeur observée dans le glycérol. Ces lignes sont représentées par les équations empiriques,

$$\frac{1}{p} = 2{,}34 + 8{,}31 \cdot 10^{-4}\frac{T}{\eta} \text{ pour HNM}$$

$$\frac{1}{p} = 2{,}34 + 8{,}31 \cdot 10^{-4}\frac{T}{\eta} \text{ pour DPNH}$$

La déviation standard d'une mesure indépendante par rapport aux lignes droites est de 2,4 % pour HNM et de 1,1 % pour DPNH.

D'après l'équation de PERRIN, le rapport des temps de relaxation rotationnelle ρ des molécules ou de leurs volumes efficaces si elles ont la même forme, est donné par :

(S = pente de la courbe de I/p en fonction de T/η)

$$\frac{\rho_2}{\rho_1} = \frac{S_1}{S_2} \times \frac{\tau_2}{\tau_1}$$

En introduisant respectivement les valeurs de 1,7 10^{-10} sec et 3,4 10^{-10} sec, $\rho_2/\rho_1 = 3{,}78$, tandis que le rapport des poids moléculaires correspondants est 663/138 = 4,81. Ces chiffres montrent que le DPNH subit une rotation comme une unité individuelle en solution aqueuse, effet auquel on peut seulement s'attendre si les parties nicotinamide et purine de la molécule sont maintenues ensemble par des forces dont la grandeur est au moins plusieurs fois RT. Les valeurs absolues des volumes efficaces sont respectivement 340 et 1 900 cm³, ce qui est probablement trop grand de plus de 50 %. C'est sans aucune doute dû au fait que l'équation (4) est une équation approximative, mais il faut remarquer que l'équation supposée plus exacte contenant le nombre d'onde de la transition O — O' au lieu de ν_a donne des valeurs encore plus élevées pour les volumes efficaces. L'application de ces équations dans les cas de bandes d'absorption et d'émission très séparées, comme pour HNM et DPNH, doit rester douteuse.

Presque 95 % de l'absorption à 254 mμ est due à la partie adénine de la molécule. Comme le rendement de transfert de l'adénine à la nicotinamide est 0,3, il en résulte que 5/6 de l'intensité de fluorescence excitée par Hg 254 est due à une excitation indirecte par l'intermédiaire de l'adénine. La polarisation observée avec cette excitation peut être prise, sans erreur sensible, comme la polarisation due à l'absorption par l'adénine suivie de transfert et d'émission. Appelons p_i une telle polarisation, p représentant comme d'habitude la polarisation de la fluorescence par excitation au Hg 366. On a alors

$$\frac{1}{p_i} + \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{p} + \frac{1}{3}\right)\frac{2}{3\cos^2\theta - 1} \quad (10)$$

où θ est l'angle entre l'oscillateur d'absorption de l'adénine et l'oscillateur d'émission de la nicotinamide. Des mesures dans une solution de sucrose à 60 % en se servant de l'appareil de la figure 1 (13) avec excitation par de la lumière naturelle, ont donné $p = 0{,}192$, $p_i = 0{,}055$. Avec ces valeurs, la dernière équation donne $\cos^2\theta = 0{,}53$; $\theta = 43°$. Cela indique que l'angle entre l'oscillateur d'absorption (adénine) et l'oscillateur d'émission (nicotinamide) est indépendant du mécanisme de transfert impliqué. Si le transfert se produit par un mécanisme d'oscillateurs couplés et si l'on fait l'hypothèse probable que la direction de l'oscillateur d'adénine impliqué dans le transfert est la même que celle de l'oscillateur d'absorption, le rendement de transfert observé β est alors égal à :

$$\beta = \frac{\mu_{an}}{\mu_{an} + \lambda_a}\cos^2\theta \quad (11)$$

où μ_{an} est la probabilité de transition du transfert et λ_a la probabilité de transition de désactivation de l'adénine par tout autre procédé. Des valeurs indiquées on tire $\mu_{an} = 3/4\ \lambda_a$, si bien qu'une proportion importante des transferts est perdue par l'orientation non favorable des oscillateurs. L'excitation de HNM dans le propylène glycol ou du DPNH dans l'eau après action de nucléotide purophosphatase, par de la lumière non polarisée Hg 254 donne une polarisation négligeable ($< 0{,}01$), si bien que l'angle entre les moments de transition de la nicotinamide pour l'absorption à 340 mμ et 254 mμ doit être approximativement de 57° Si les deux directions se trouvent dans le plan de l'anneau de nicotinamide et si dans le complexe moléculaire de DPNH les anneaux de nicoti-

namide et d'adénine sont parallèles, les moments de transition de l'absorption des deux anneaux pour la radiation de 254 mμ doivent alors être à peu près parallèles. Ce parallélisme approché est nécessaire pour expliquer la forte interaction qui conduit à une diminution de l'absorption et à l'élargissement de la bande de l'adénine à 260 mμ.

Association de HNM et de purines en solution.

Le rendement de fluorescence, de même que le spectre de fluorescence et le spectre d'absorption de HNM en solution ne sont pas ostensiblement modifiés par l'addition de caféine ou d'adénosine. La polarisation de la fluorescence subit un accroissement constant lorsqu'on ajoute des purines et, puisque le rendement de fluorescence demeure non modifié, il en résulte que l'accroissement de polarisation doit correspondre à un accroissement du volume moléculaire efficace de HNM, ce qui se produirait s'il s'était formé un complexe intermoléculaire. On a utilisé de préférence la caféine en raison de sa plus grande solubilité dans l'eau et également parce qu'elle peut être obtenue pratiquement débarrassée d'impuretés fluorescentes par cristallisation répétée. A toute concentration de caféine, la polarisation $\bar{p}$ observée est une moyenne pondérale selon les contributions à l'intensité des molécules libres et des molécules complexées. Si ces dernières donnent la polarisation p_c et les premières p, nous avons

$$\bar{p} = \alpha p + (1 - \alpha) p_c; \qquad \alpha = \frac{p_c - \bar{p}}{p_c - p}$$

où α est le degré de dissociation du complexe. Lorsque $\bar{p}$ est intermédiaire entre p et p_c, la concentration de caféine C_0 est égale à K, constante de dissociation du complexe. La figure 8 représente la courbe de $\bar{p}$ en fonction de C_0 pour trois températures. Il n'est pas possible de calculer la valeur exacte de K à chaque température, parce qu'il n'était pas possible de déterminer p_c avec précision du fait de la solubilité limitée de la caféine. Cependant, d'après les inflexions présentées par les courbes, K semble être 4-5 10^{-2} M/litre, correspondant à une énergie libre de formation de presque 2 kcal. La variation de K avec la température est très faible, l'enthalpie de formation du complexe étant inférieure à 1 kcal. Ces chiffres, bien qu'approximatifs, montrent la similitude du complexe avec celui formé par l'adénine ou la caféine et l'isoalloxazine ([12]). Les forces impliquées dans les deux cas sont probablement des forces de Van der WAALS entre les anneaux plats, ce qui est indiqué par le fait que, dans le chloroforme, la polarisation de fluorescence de HNM n'était pas modifiée par addition de caféine. Le fait que les complexes de DPNH et de FAD sont détruits dans une solution de propylène glycol peut être expliqué par la régularité de la structure de l'eau comparée à celle du propylène glycol. Les constituants du complexe sont expulsés de la structure

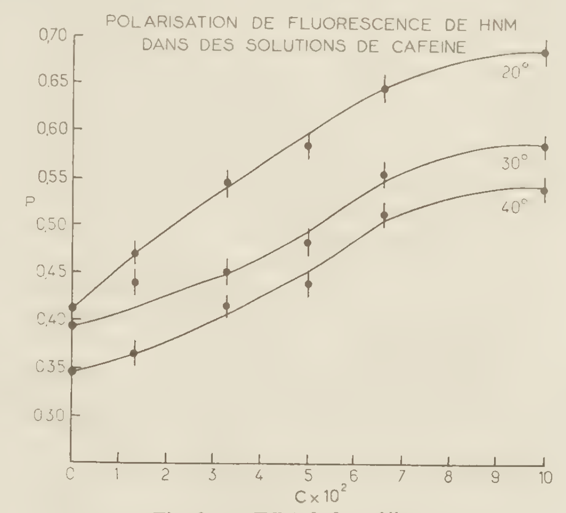


Fig. 8. — Effet de la caféine sur la polarisation de la fluorescence de HNM.

de l'eau et peuvent tenir ensemble grâce à de faibles forces de Van der WAALS, tandis que dans le propylène glycol ces mêmes forces entre chaque constituant et le solvant sont capables de surmonter les faibles interactions qui existent entre les molécules de solvant d'une part et entre les constituants d'autre part.

Discussion.

Les résultats donnés montrent, en conclusion, l'existence d'un complexe intramoléculaire dans le DPNH entre les parties nicotinamide et purine de la molécule, analogue à celui déjà décrit dans la flavine adénine dinucléotide. Les modifications du spectre d'absorption observées après traitement avec de la nucléotide pyrophosphatase et le transfert d'énergie lui-même ne peuvent pas être jugés comme concluants puisque les modifications spectrales résultant des effets de transfert de charge peuvent être le résultat d'un contact par collision des constituants ([19]). Cependant, les chances de tels contacts, de se produire par collision en raison de l'agitation thermique, sont trop faibles pour expliquer les grandes modifications dans l'absorption à 260 mμ ou un transfert avec un rendement de 30 %. On obtient des preuves encore plus concluantes de l'existence d'un complexe grâce aux mesures de la polarisation de fluorescence qui donnent pour DPNH un temps de relaxation rotationnelle environ 6 fois plus grand que celui de HNM. En raison du nombre de simples liaisons interposées entre la nicotinamide et l'adénine autour

desquelles une rotation est possible, on ne pourrait trouver un si grand temps de relaxation rotationnelle que si l'adénine et la nicotinamide étaient maintenues ensemble par des forces relativement stables à l'agitation thermique. Il ressort de l'étude du complexe observé dans l'eau entre la caféine et HNM, que les forces impliquées dans le complexe sont des forces de dispersion entre les anneaux plats, mais on n'a pas exclu l'existence d'une faible liaison hydrogène. L'accroissement d'absorption à 260 mμ après traitement avec la nucléotide pyrophosphatase est semblable à celui trouvé dans les acides nucléiques après hydrolyse ([20]) ou l'action d'autres agents qui produisent des modifications irréversibles dans la molécule d'acide nucléique. Le fait que ces modifications sont semblables en signe et en grandeur dans les complexes plus simples indique que dans les acides nucléiques il faut en chercher la cause dans l'interaction des anneaux de purine à proximité, peut-être dans les anneaux de purine appariés dont l'hypothèse est faite dans certains points de vue habituels sur la structure de l'acide nucléique. Le parallélisme approché des moments de transition des structures en interaction est nécessaire, et la destruction de ce parallélisme par des agents qui ne produisent pas de modifications chimiques appréciables est possible; le résultat en est ce que l'on peut appeler par analogie avec le cas des protéines « une dénaturation ».

Le transfert d'énergie électronique dans le complexe peut se produire par l'un des trois mécanismes possibles :

1. Transfert de l'état de singlet de l'adénine par un mécanisme d'oscillateurs couplés.

2. Transfert de l'état de triplet de l'adénine.

3. Transfert électronique, ou plutôt échange d'électron entre les constituants.

Le mécanisme 2 qui exige la violation du principe de conservation du spin peut être exclu, parce que la vitesse de la modification de la polarisation de fluorescence avec la viscosité par excitation avec Hg 254 est semblable à celle avec excitation par Hg 366 ([13]), ce qui indique que le transfert n'allonge pas de façon appréciable la durée de l'état excité; allongement qui semble inévitable si c'est le processus 2 qui se produit.

Le mécanisme 3 exige l'échange d'un électron à l'état fondamental pour un électron à l'état excité, et semble improbable de façon inhérente, surtout si l'on compare avec le mécanisme 1, dont on connaît la théorie et de nombreux exemples.

Le rendement fluorescent de l'adénine ou de l'acide adénylique est certainement inférieur à 1 %, probablement inférieur à 0,01 %. Si l'on se sert, pour la durée de vie naturelle de l'état excité de l'adénine, de la valeur habituelle de 10^{-8} sec., il en résulte que le transfert entrera en compétition à égalité avec une probabilité de transition désactivante de 10^{11}-10^{12} sec^{-1}, et sera lui-même de cet ordre de grandeur qui est comparable à la valeur de la probabilité de transfert observée dans les cristaux d'anthracène ([21]). Comme il n'y a pas de fluorescence mesurable provenant de l'adénine, il n'est pas possible de calculer le recouvrement de son spectre d'émission avec le spectre d'absorption de la nicotinamide. La place de l'émission maximum de l'adénine déterminera aussi la probabilité de transfert de l'état excité de singlet à partir d'une molécule d'adénine vers une autre molécule d'adénine, processus qui n'a pas été démontré.

BIBLIOGRAPHIE

(1) F.W.J. Teale et G. Weber. — *Biochem. J.*, 1957, **65**, 476.
(2) G. Weber et F. W. J. Teale. — *Trans. Faraday Soc.*, 1958, sous presse.
(3) G. Weber et F.W.J. Teale — *Trans. Faraday, Soc.*, 1957, 53, 646.
(4) G. Weber. — *J. Opt. Soc. Amer.*, 1956, **46**, 962.
(5) J.S. Hall. — *J. Opt. Soc. Amer.*, 1952, **41**, 963.
(6) B. Lyot. — *Annales de l'observatoire de Paris* (sec. de Meudon), 1926, 7, 100.
(7) P. Karrer, G. Schwarzenbach, F. Benz et U. Solmssen. — *Helvetica*, 1936, **19**, 811.
(8) M. E. Pullman, A. San Pietro et S. P. Colowick. — *J. Biol. Chem.*, 1954, **206**, 129.
(9) G.W. Rafter et S. P. Colowick. — *J. Biol. Chem.*, 1954, **209**, 774.
(10) A. Kornberg et W. E. Pricer. — *J. Biol. Chem.*, 1950, **182**, 763.
(11) L.G. Whitby. — *Biochem. J.*, 1953, **54**, 437.
(12) G. Weber. — *Biochem* 1950, **47**, 114.
(13) G. Weber. — *Nature*, London, 1957, **180**, 1049.
(14) E. Lippert. — *Z. Elecktrochemie*, 1957, **61**, 962.
(15) F. Perrin. — *J. Physique*, 1926, 7, 390.
G.N. Lewis et M. Kasha. — *J. amer. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 994.
(16) Th. Forster. — *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*, Gottingen, 1951, p. 154.
(17) F. Perrin. — *Ann. Phys.*, Paris, 1929, **12**, 169.
G. Weber. — *Adv. in Protein Chemistry*, 1953, **8**, 415.
(18) A. Jablonski. — *Acta. Phys. Polon.*, 1950, **10**, 193.
(19) R.S. Mulliken. — *Rec. Trav. chim.*, 1956, **75**, 845.
(20) G. H. Beaven, E. R. Holiday et E. A. Johnson. — *The Nucleic Acids. Academic Press*, 1955, **1**, 52.
(21) G. T. Wright. — *Proc. Phys.. Soc.*, London, 1955, **B. 68**, 929.

DISCUSSION

G. Weber (*en réponse à une question de* E. Rabinowitch). — On peut en théorie faire une distinction entre le mécanisme I cité dans le mémoire (oscillateurs couplés) et le mécanisme 3 (échange d'électrons) en observant la polarisation par excitation indirecte. Le mécanisme d'oscillateurs couplés exige un certain parallélisme des oscillateurs qui est donné par l'équation 11. Si $\beta < \cos^2 \theta$ le mécanisme de transfert par oscillateurs couplés ne peut être invoqué. Il y aurait intérêt à relier ces deux quantités dans tous les cas possibles pour savoir s'il y a des cas de transfert où l'explication des oscillateurs couplés n'est pas valable.

L'ANTHRACÈNE ET SES DERIVÉS, SENSIBILISATEURS DE RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES

par Robert LIVINGSTON

[*Institute of Technology, Minneapolis*]

Traduit par Mme J. Cyrot

SOMMAIRE

L'anthracène et ses dérivés peuvent sensibiliser les oxydations photochimiques. Le mécanisme de ces oxydations sensibilisées apparaît identique, sauf pour le stade final, à celui de l'autoxydation du sensibilisateur. Ce mécanisme général est également compatible avec les résultats d'études de la dimérisation photochimique de l'anthracène, de l'extinction de sa fluorescence et d'études de photolyse par éclair de réactions de la molécule d'anthracène à l'état de triplet. On a déterminé directement les constantes de vitesse de beaucoup des stades de la réaction qui constituent le mécanisme. Les valeurs ainsi obtenues sont compatibles avec les données photochimiques.

Dans les processus de photosensibilisation, la molécule initialement excitée peut transférer son énergie directement ou provoquer des réactions subséquentes avec un des constituants. Les produits de ces réactions primaires sont souvent des radicaux libres. Dans les autoxydations sensibilisées par l'anthracène, il semble que ce soit des moloxydes instables plutôt que des radicaux qui constituent les intermédiaires de la réaction. Dans une réaction photosensibilisée vraie, le sensibilisateur ne subit pas une modification chimique permanente. S'il réagit dans le processus primaire pour former un intermédiaire instable, il reprend son état originel à la suite de réactions subséquentes.

Indépendamment de la fluorescence sensibilisée ([1, 2, 3]) et de la phosphorescence sensibilisée ([3, 4]) on connaît quelques processus dans lesquels une molécule polyatomique initialement excitée transfère directement son énergie d'excitation à un constituant. L'exemple le mieux établi ([5]) d'une telle réaction photochimique est la décomposition de l'iodure d'éthyle sensibilisée par le naphtalène. L'énergie d'excitation de l'état fluorescent (singlet) et de l'état métastable (triplet) du naphtalène peut être transférée par une collision de seconde espèce à une molécule d'iodure d'éthyle, provoquant sa dissociation.

Dans les autoxydations sensibilisées par la quinone, il se forme une semiquinone par réaction entre la quinone à l'état fluorescent et une molécule normale du réducteur. Des réactions secondaires régénèrent la quinone et forment les produits d'oxydation stables de la réaction. De telles réactions sont des processus en chaîne et suivent souvent des lois cinétiques compliquées. Par contre, la cinétique des oxydations photochimiques de l'anthracène et de ses dérivés est relativement simple. Ces réactions ne comportent aucun radical et leurs produits, dans des conditions normales, sont simples, généralement des peroxydes transannulaires ([7]).

Les autoxydations sensibilisées par l'anthracène et la formation photochimique directe de peroxyde d'anthracène semblent correspondre à des mécanismes tout à fait similaires. En plus des états fluorescent et de triplet fondamental du sensibilisateur, qui certainement jouent des rôles importants dans ces réactions, on a suggéré trois intermédiaires possibles, savoir un dimère d'anthracène réactif instable, un état de singlet de l'oxygène moléculaire métastable, ou un moloxyde réactif d'anthracène de courte durée de vie. On peut imaginer, pour chacun de ces intermédiaires supposés, des mécanismes compatibles avec les données empiriques de vitesse. Pour décider quelle est la plus probable de ces trois alternatives il faut utiliser des preuves autres que celles déduites des mesures des rendements quantiques.

Lorsque Dufraisse ([8]) a suggéré l'existence d'un dimère réactif, ce dimère était compatible avec tous les renseignements dont on disposait et avait en outre l'avantage d'exprimer les mécanismes de dimérisation et d'autoxydation de l'anthracène en fonction d'une seule série d'intermédiaires. Depuis, il a été démontré ([7]) que le dimère se forme toujours directement à partir de l'état fluorescent; par contre le peroxyde peut être produit par des réactions soit de l'état fluorescent soit de l'état de triplet de l'anthracène. Dans les solvants qui suppriment à la fois la fluorescence et la dimérisation, l'oxydation se pro-

duit exclusivement par la voie de l'état de triplet. Cela montre que la dimérisation et l'oxydation ne comportent pas des intermédiaires identiques. En outres, des mesures [9, 10] de la vitesse de disparition de l'état de triplet montrent qu'il réagit très efficacement (c'est-à-dire à chaque rencontre) avec l'oxygène, mais de façon non décelable avec les molécules normales d'anthracène. En considération de ce fait, nous pouvons envisager pour l'autoxydation tout mécanisme dans lequel on suppose qu'un dimère réactif est un intermédiaire essentiel.

Kautski [11] a émis l'hypothèse que les oxydations sensibilisées étaient dues aux molécules d'oxygène dans leur état métastable de singlet, auquel elles ont été amenées par des chocs avec les molécules excitées du sensibilisateur. Ainsi que l'a montré Gaffron [12], ce mécanisme ne peut expliquer toutes les autoxydations sensibilisées. De plus, l'interaction d'un anthracène à l'état de triplet avec un oxygène stable à l'état de triplet, pour former deux molécules dans leurs états de singlets, et un processus qui est en contradiction avec la loi de la conservation du spin de Wigner. C'est pour ces raisons et d'autres moins directes que nous sommes probablement autorisés à rejeter le mécanisme de Kautski comme extrêmement improbable.

La possibilité restante, que l'intermédiaire soit un moloxyde réactif de courte durée de vie, a été envisagée par Koblitz et Schumacher [13] dans leur explication de la cinétique de l'autoxydation du rubrène. Par la suite, ce point de vue a été défendu et étendu à d'autres cas par Schenck [14]. Bien qu'il n'y ait pas de preuve directe de l'existence de tels moloxydes réactifs de courte durée de vie, ils semblent bien être les plus probables des trois intermédiaires proposés pour essayer d'imaginer un mécanisme compatible avec la cinétique de l'autoxydation de l'anthracène, etc..., et de certains types d'oxydations sensibilisées.

Les stades suivants de réaction constituent un mécanisme compatible avec les mesures publiées pour les oxydations sensibilisées par l'anthracène et avec l'autoxydation et la dimérisation de l'anthracène. Ce mécanisme s'accorde aussi avec les mesures de rendement de fluorescence, extinction de la fluorescence et la vitesse de disparition de l'état de triplet de l'anthracène, etc...

1. $h\nu + A = A^*$	Absorption de lumière;
2. $A^* = A + h\nu$	Emission de fluorescence;
3. $A^* = A'$	Conversion interne;
4. $A^* = A$	Conversion interne;
5. $A + A^* = 2A$	Auto-extinction de la fluorescence;
6. $A + A^* = A_2$	Dimérisation;
7. $A' = A$	Conversion interne;
8. $O_2 + A^* = O_2A'$	Formation du moloxyde réactif;
9. $O_2 + A = O_2A'$	Formation du moloxyde réactif;
10. $O_2A' = O_2 + A$	Décomposition du moloxyde réactif;
11. $A + O_2A' = AO_2 + A$	Formation de peroxyde d'anthracène;
12. $R + O_2A' = RO_2 + A$	Formation du peroxyde secondaire.

Les symboles spéciaux ont la signification suivante : A, A^*, A', O_2A', AO_2 et A_2 représentent respectivement l'état fondamental, l'état fluorescent, l'état de triplet le plus bas, le moloxyde réactif, le peroxyde stable et le dimère stable de l'anthracène; R et RO_2 représentent l'état fondamental et le produit d'oxydation stable du réducteur ajouté.

En faisant les approximations usuelles pour l'état stationnaire, on peut établir les équations suivantes pour le mécanisme supposé :

$$\varphi_{AO_2} = \frac{[A][O_2]}{\{k_2 + k_3 + k_4 + (k_5 + k_6)[A] + k_8[O_2]\} \cdot \{k_{10}/k_{11} + [A] + (k_{12}/k_{11})[R]\}} \times \left(k_8 + \frac{k_3}{k_7/k_9 + [O_2]}\right) \quad (1)$$

$$\frac{\varphi_{RO_2}}{\varphi_{AO_2}} = \frac{k_{12}[R]}{k_{11}[A]} \quad (2)$$

$$\frac{\varphi^0_{AO_2}}{\varphi_{AO_2}} = 1 + \frac{(k_{12}/k_{10})[R]}{1 + (k_{11}/k_{10})[A]} \quad (3)$$

Dans ces équations, les symboles φ_{RO_2}, φ_{AO_2} et $\varphi^0_{AO_2}$ représentent respectivement les rendements quantiques de l'oxydation sensibilisée du réducteur R, l'oxydation dans le mélange de sensibilisateur A, et l'oxydation de A en l'absence de R.

Beaucoup de ces constantes de vitesse peuvent être calculées à partir des résultats publiés. Par intégration graphique du coefficient d'extinction du 9,10-diphényl-anthracène Bowen [15] a calculé pour k_2 $1{,}3 \times 10^8$ sec^{-1}. Puisque le rendement maximum de fluorescence de ce composé dans le benzène est 0,80 on a

$$k_3 + k_4 = (0{,}20/0{,}80)\, 1{,}3 \times 10^8 = 3{,}2 \times 10^7 \ \text{sec}^{-1}.$$

La dimérisation photochimique et l'auto-extinction de fluorescence [15] du diphényl anthracène ont toutes deux trop peu d'importance pour être décelables; par comparaison avec les valeurs des autres constantes, nous pouvons conclure que

$$(k_5 + k_6) < 10^7 \ \text{m}^{-1} \, \text{sec}^{-1}.$$

L'extinction de la fluorescence par l'oxygène a été mesurée [15] et conduit à $k_8 = 3{,}7 \times 10^{10}$ m^{-1} sec^{-1}. Des études préliminaires de photolyse par éclair [16]

montrent que k_7 et k_9 sont approximativement égaux à 2×10^3 sec^{-1} et 4×10^9 m^{-1} sec^{-1}. Les paramètres restants $k_3/(k_3 + k_4)$, k_{10}/k_{11} et k_{12}/k_{11} peuvent être obtenus à partir des mesures photochimiques. Pour accorder l'équation avec les valeurs expérimentales pour l'autoxydation du diphényl anthracène, on a assigné respectivement au premier et au second de ces paramètres les valeurs 0,70 et 0,045. En introduisant les valeurs des diverses constantes dans l'équation I et en procédant aux simplifications numériques, nous obtenons

$$\varphi_{AO_2} = \frac{7 \times 10^{-4} + [O_2]}{5 \times 10^{-3} + [O_2]} \times \frac{[A]}{0{,}045 + [A]} \qquad (4)$$

Les courbes des figures 1 et 2 sont les représentations graphiques de cette équation; les points et les cercles représentent les valeurs expérimentales correspondantes.

La réaction photosensibilisée ([16]) a été étudiée en éclairant des mélanges d'anthracène et de diphényl anthracène dans le benzène avec de la lumière ayant une longueur d'onde d'environ 4 050 Å, qui n'est absorbée que par le dernier composé. Les valeurs relatives des niveaux d'énergie de ces deux composés sont telles qu'un transfert direct d'énergie d'excitation du diphényl anthracène à l'anthracène est impossible. Par suite l'oxydation sensibilisée de l'anthracène doit impliquer le moloxyde du sensibilisateur (diphényl anthracène). Comme on pouvait le prévoir d'après le mécanisme (voir équation 2) l'oxydation sensibilisée s'accompagne de l'oxydation directe du diphényl anthracène. Dans l'étude expérimentale, on a mesuré au spectrophotomètre les vitesses individuelles de disparition des deux hydrocarbures. Pendant l'irradiation de chaque mélange, un deuxième récipient contenant une solution de diphényl anthracène (seul) était exposé à une lumière de même intensité et de même longueur d'onde.

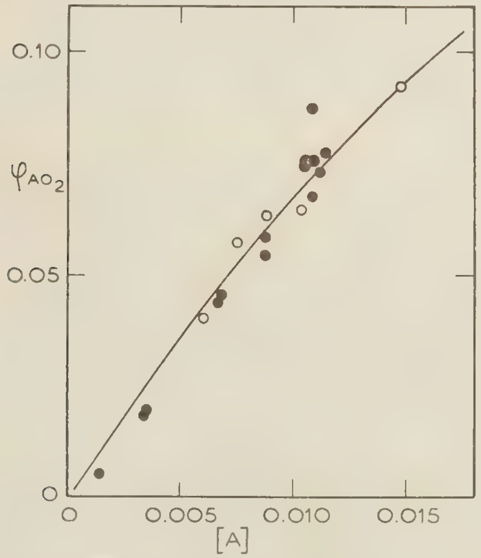


Fig. 1. — Autoxydation du diphényl anthracène
○ données selon la référence 16
● données selon la référence 17 *b*, normalisées selon les autres données.

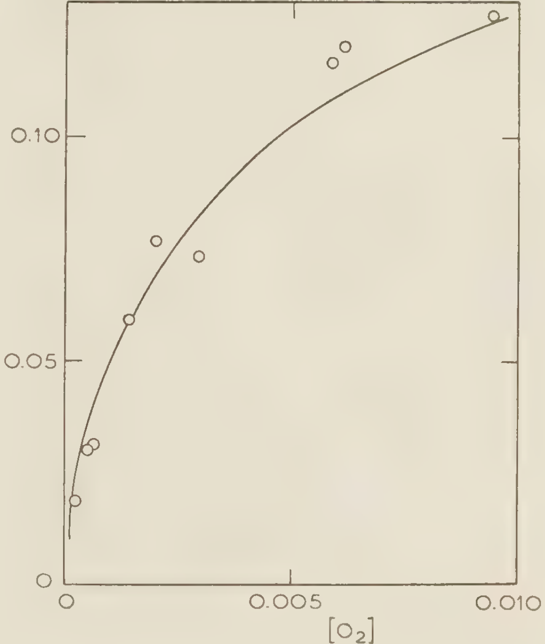


Fig. 2. — Autoxydation du diphényl anthracène.

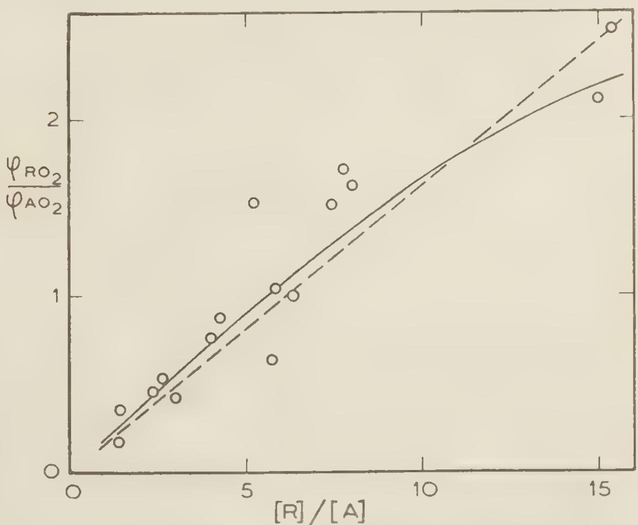


Fig. 3. — Autoxydation d'un mélange d'anthracène, R, et de diphényl-anthracène, A.

La figure 3 montre une vérification de l'équation 2. La dispersion des points expérimentaux est grande mais ils se concilient en général avec une ligne droite passant par l'origine et de pente 0,163. En introduisant cette valeur pour k_{12}/k_{11} et 0,045 pour k_{10}/k_{11} dans l'équation 3, nous obtenons

$$\frac{\varphi^0_{AO_2}}{\varphi_{AO_2}} = 1 + \frac{3,62[R]}{1 + 22,2[A]} \qquad (5)$$

Les valeurs de ce rapport de rendements quantiques, calculées à l'aide de cette équation pour le domaine de concentrations utilisée dans les expériences, varient de 1,04 à 1,19 et dépendent nettement de [R]. Par contre, la moyenne des valeurs expérimentales est $0,96 \pm 0,06$ et ces valeurs ne semblent pas dépendre beaucoup ni de [R] ni de [R]/[A]. Cet écart est probablement trop grand pour être attribué à des erreurs expérimentales et conduit à supposer que le mécanisme devrait être modifié.

Il y a peu de doute en ce qui concerne la validité réelle des stades 1 à 10, mais la structure de O_2A' et la nature de sa réaction sont tout à fait inconnues. Il est parfaitement possible qu'une rencontre entre une molécule de moloxyde et une molécule du réducteur puisse parfois provoquer la formation d'une molécule de peroxyde de diphényl anthracène. En tenant compte de cette possibilité, le stade 12 devrait être remplacé par

$$12' \quad R + O_2A' = AO_2 + R$$
$$12'' \quad R + O_2A' = RO_2 + A$$

Si nous représentons les vitesses des stades 12′ et 12″ respectivement par

$$ak_{12}\,[R]\,[O_2A'] \quad \text{et} \quad (1 - a)k_{12}[R]\,[O_2A'],$$

les formes modifiées correspondantes des équations 2 et 3 sont

$$\frac{\varphi_{RO_2}}{\varphi_{AO_2}} = \frac{(1 - a)(k_{12}/k_{11})[R]/[A]}{1 + a(k_{12}/k_{11})[R]/[A]} \qquad (6)$$

$$\frac{\varphi^0_{AO_2}}{\varphi_{AO_2}} = \left(1 + \frac{(k_{12}/k_{11})[R]}{k_{10}/k_{11} + [A]}\right)\left(1 + a\frac{k_{12}[R]}{k_{11}[A]}\right)^{-1} \qquad (7)$$

La courbe de la figure 3 est une représentation graphique de l'équation 6, dans laquelle $a = 0,12$ et $k_{12}/k_{11} = 0,235$. En introduisant ces valeurs et $k_{10}/k_{11} = 0,045$ dans l'équation 7, la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées de $\varphi^0_{AO_2}/\varphi_{AO}$ semble être de l'ordre des erreurs expérimentales. La moyenne des valeurs calculées est $0,98 \pm 0,05$, tout à fait comparable à la valeur expérimentale $0,96 \pm 0,06$.

Bowen et Tanner [17] ont démontré que l'anthracène peut aussi agir comme un sensibilisateur. Ils ont éclairé un mélange d'anthracène et de diphényl anthracène dans le sulfure de carbone, avec de la lumière de longueur d'onde 3 650 Å qui est absorbée dans une mesure comparable par les deux hydrocarbures. Le rapport observé de la vitesse de formation du peroxyde de diphényl anthracène à celle pour l'anthracène était toujours plus grand que celui qui aurait été obtenu si l'autoxydation des deux substances s'était produite de façon indépendante. Alors que ces résultats montrent clairement que l'anthracène peut sensibiliser l'oxydation du diphényl anthracène, ils ne sont pas suffisamment étendus ni précis pour permettre une analyse détaillée de ce système relativement complexe, où chacun des hydrocarbures agit comme sensibilisateur et substrat.

De même que l'anthracène, le rubrène peut servir soit de sensibilisateur soit de réducteur. Gaffron a montré [18] que le rubrène peut efficacement sensibiliser l'oxydation de l'allylthiourée. Il a également montré que l'autoxydation photochimique du rubrène est fortement ralentie par de fortes concentrations d'allylthiourée. Plus récemment, Rao [19] a mesuré simultanément les vitesses d'oxydation du rubrène et de l'allylthiourée dans l'acétone. Ses résultats sont résumés dans le tableau I.

TABLEAU I

Autoxydation de l'allyl-thiourée sensibilisée par le rubrène

$[A] \times 10^5$	$[R] \times 10^3$	$[O_2] \times 10^3$	φ_{RO_2}	φ_{AO_2}	$\frac{\varphi_{RO_2}}{\varphi_{AO_2}} \cdot \frac{[A]}{[R]}$
0,89	1,0	2,7	0,16	0,0106	0,13
0,89	5,0	2,7	0,43	0,0068	0,11
0,91	5,0	2,9	0,48	0,0071	0,12
1,15	5,0	0,35	0,14	0,0029	0,14
3,48	5,0	2,5	0,44	0,0190	0,15
0,95	10,0	2,5	0,50	0,0051	0,09

Dans ce tableau A désigne le rubrène et R l'allylthiourée. La constance des valeurs de la dernière colonne indique que les résultats de ces mesures sont conformes à l'équation 2. Les données ne sont pas suffisamment précises pour justifier l'utilisation de l'équation 6. Il est remarquable que la moyenne des valeurs de la sixième colonne soit très voisine de $k_{12}/k_{11} = 0,16$ pour le système diphényl anthracène-anthracène. Cependant les résultats de plusieurs études publiées [13, 18] sur l'autoxydation du rubrène ne sont pas compatibles les uns avec les autres et, en outre, ils ne semblent pas conformes à l'équation 1. Par conséquent il ne faut considérer l'interprétation des données relatives au rubrène suivant le mécanisme présenté dans ce mémoire que comme une tentative d'explication.

BIBLIOGRAPHIE

(1) J. Perrin et Mlle Choucroun. — *C.R.*, 1929, **189**, 1213.
(2) T. Förster. — *Fluoreszenz Organischer Verbindungen.* Vandenhoeck und Ruprecht, Gottingen, 1951.

(3) R. LIVINGSTON. — *Journ. Phys. Chem.*, 1957, **61**, 860.
(4) A. TERENIN et V. ERMOLAEV. — *Doklady Akad. Nauk*, 1952, **85**, 547; *idem, Trans. Farad. Soc.*, 1956, **52**, 1042.
(5) W. WEST et W. MILLER. — *Journ. Chem. Phys.*, 1940, **8**, 849.
W. WEST. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1941, **41**, 203.
(6) a) H. BÄCKSTRÖM. — *The Svedberg. Almquist and Wicksell's.* Uppsala, 1944, pp. 45-64.
b) G. PORTER. — (Résultats non publiés), 1957.
(7) E. BOWEN. — *J. Disc. Farad. Soc.*, 1953, **14**, 143.
(8) *a*) C. DUFRAISSE et M. GÉRARD. — *C.R.*, 1935, **201**, 428.
b) C. DUFRAISSE. — *Bull. Soc. chim.*, 1939, **6**, 422.
(9) G. PORTER et M. WINDSOR. — *Disc. Farad. Soc.*, 1954, **17**, 178.
(10) R. LIVINGSTON et D. TANNER. — *Trans. Farad. Soc.*, (sous presse).
(11) *a*) H. KAUTSKY et coll. — *Ber.*, 1933, **66**, 1588.
b) H. KAUTSKY — *Biochem. Z.*, 1937, **291**, 271.
(12) H. GAFFRON. — *Ber.*, 1935, **68**, 1409; *idem., Biochem. Z.*, 1936, **287**, 130.
(13) H. KOBLITZ et W. SCHUMACHER. — *Z. physik. Chem.*, 1935, **B 35**, 11; *idem, ibid.*, 1937, **B 37**, 462; Cf. A. SCHÖNBERG, — *Ann. Chem.*, 1935, **518**, 300.
(14) G. SCHENCK. — *Z. Electrochem.*, 1952, **56**, 855.
(15) E. BOWEN. — *J. Trans. Farad. Soc.*, 1954, **50**, 97.
(16) S. V. RAO. — *Thèse de doctorat.* Univ. de Minn., 1958.
(17) *a*) E. J. BOWEN et D. TANNER. — *Trans. Farad. Soc.*, 1955, **51**, 475.
b) D. TANNER. — *Doctorat Thesis.* Oxford Univ., 1954.
(18) H. GAFFRON. — *Zeit. physik. Chem.*, 1937, **B 37**, 437.
(19) S. V. RAO. — *Masters Thesis.* Univ. of Minn., 1955.

DISCUSSION

G. Porter. — La réaction

$$\text{triplet} + O_2\,(\text{triplet}) \rightarrow \text{Singlet} + O_2\,(\text{singlet})$$

est-elle réellement interdite par la règle de conservation du spin? Le moment du spin se conserve au total dans l'état de transition.

R. Livingston. — On doit admettre que le mécanisme de KAUTSKY n'est pas nettement établi. La théorie en ce qui concerne la double transition n'est certainement pas définitive. Cependant les théoriciens que j'ai consultés sont d'avis qu'une telle transition est hautement improbable. L'ancienne observation de GAFFRON, que la bactériochlorophylle est capable de sensibiliser les photo-autoxydations à la lumière du proche infrarouge, apporte des preuves supplémentaires contre le mécanisme de KAUTSKY.

A. N. Terenin. — Le mécanisme de KAUTSKY, mentionné par R. LIVINGSTON dans son analyse comparative des différentes théories et qui consiste en un simple transfert d'énergie à la molécule O_2, n'est pas valable non plus si l'on considère que la molécule NO qui possède un niveau trop élevé pour la possibilité d'un transfert d'énergie produit néanmoins des effets semblables à ceux de O_2.

H. P. Kallmann. — Nous avons étudié l'interaction entre l'anthracène et le diphénylanthracène excité et vice-versa. Tandis que l'anthracène provoque une forte extinction et le diphénylanthracène une très faible, l'extinction combinée de l'anthracène et du diphénylanthracène est *nulle*. Cela montre que l'interaction entre une molécule excitée d'un certain type et les autres est faible. Si l'on étudie l'anthracène et le méthylanthracène, on observe une interaction entre une molécule excitée d'un certain type et une molécule d'un autre type.

E. Rabinowitch. — Comme R. LIVINGSTON, j'ai reçu des différents théoriciens différentes réponses sur l'applicabilité de la règle de WIGNER. Quand deux molécules changent de spin en même temps, mais que le spin total du système est conservé, la transformation est « deux fois prohibée » quand les molécules ne sont pas couplées et « deux fois permise » quand le couplage est suffisamment fort. Ce qu'on voudrait obtenir des théoriciens, c'est de savoir si, dans un cas concret, on se trouve plus près de l'un ou de l'autre de ces cas extrêmes, quand la loi de conservation du spin doit être appliquée seulement au système total et quand elle doit être appliquée aux deux composants séparément.

CINÉTIQUE ET INHIBITION DE RÉACTIONS PHOTOSENSIBILISÉES EN PRÉSENCE D'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE

par G.O. SCHENCK et K. GOLLNICK.

[*Organisch-chemisches Institut der Universität, Göttingen.*]

SOMMAIRE

Le transfert photosensibilisé de l'oxygène aux accepteurs appropriés passe par deux produits intermédiaires excités et de courte durée de vie, le Sens^{rad} et le Sens$^{rad}O_2$.

Le transfert de l'oxygène photosensibilisé par le rose de bengale à l'α-terpinène est inhibé par le cyclo-octatétraène (0,51), l'hydroquinone (0,26), la benzidine (3,90), la diméthyle-aniline (0,77) et l'α-terpinène lui-même (0,013), qui tous désactivent le Sens^{rad}. Les constantes inhibitrices, comparées à celle avec O_2 (= 1,00), sont analogues aux chiffres indiqués entre parenthèses. L'effet désactivant caractéristique des quinones sur des molécules excitées par des moyens photochimiques peut être également constaté, si l'on prend des quinones telles que la 1,8-dihydroxy-anthraquinone comme sensibilisateur. Le rendement quantique décroît donc dans la synthèse de l'ascaridol, à mesure qu'on augmente la concentration de 1,8-dihydroxy-anthraquinone, comme sensibilisateur.

Un nouvel effet d'inhibition est exercé par la nicotine dans le transfert photosensibilisé de l'O_2. Alors que des inhibiteurs tels que la *p*-benzoquinone, etc., constituent des catalyseurs pour le passage des molécules électroniquement excitées à l'état non excité, la nicotine possède à côté de ses propriétés moins remarquables d'accepteurs celle d'être un catalyseur pour la décomposition du Sens$^{rad}O_2$ en Sens et O_2.

Introduction.

Le transfert photosensibilisé de l'oxygène aux accepteurs appropriés (A) passe en général par deux produits intermédiaires cinétiquement reconnaissables et de courte durée de vie, que nous appellerons le Sens^{rad} et le Sens$^{rad}_{\cdots}O_2$. Le cycle de sensibilisation qui en résulte fut démontré pour la première fois par la synthèse de l'ascaridol effectuée par G. O. Schenck en 1948 ([1]). Sa formule est pour le cas le plus simple la suivante :

$$\mathrm{Sens} \xrightarrow{+h\nu} \mathrm{Sens}^{rad}$$
$$\mathrm{Sens}^{rad} \xrightarrow{k_4} \mathrm{Sens}$$
$$\mathrm{Sens}^{rad} \xrightarrow[k_2]{+O_2} \mathrm{Sens}^{rad}\cdots O_2$$
$$\mathrm{Sens}^{rad}\cdots O_2 \xrightarrow{k_5} \mathrm{Sens}+O_2$$
$$\mathrm{Sens}^{rad}\cdots O_2 \xrightarrow[k_3]{+A} AO_2 + \mathrm{Sens}$$

Le sensibilisateur excité par des moyens photochimiques est appelé le Sens^{rad}. Le Sens^{rad} comprend sommairement tous les états de singlet et de triplet biradicaux, à partir desquels le Sens$^{rad}_{\cdots}O_2$ peut être formé (*), (2). Le Sens$^{rad}_{\cdots}O_2$ transfère ensuite l'oxygène à un accepteur (A), le plus souvent en formant du peroxyde AO_2. Les deux produits intermédiaires peuvent, par des voies différentes, se retransformer à l'état non excité du sensibilisateur.

Le Sens^{rad} peut être détruit non seulement par l'auto-inactivation ou par une réaction avec de l'O_2, mais aussi au moyen de réactions avec les accepteurs employés, avec des inhibiteurs, ainsi qu'avec le sensibilisateur non excité. Dans la chimie des processus d'inhibition de luminescence on connaît des phénomènes analogues. Si l'accepteur absorbe 1 mol O_2, la vitesse de formation du produit final est égale à la vitesse d'absorption de l'O_2, c'est-à-dire :

$$v_{O_2} = \frac{dO_2}{dt} = \frac{dAO_2}{dt} = I_{abs}\,\frac{k_2[O_2]}{k_2[O_2]+k_4+k_{Inh}[Inh]}\,\frac{k_3[A]}{k_3[A]+k_5} \qquad (1)$$

resp.

$$v_{O_2} = \frac{dO_2}{dt} = \frac{dAO_2}{dt} = I_{abs}\,\frac{1}{1+K_4+K_{Inh}[Inh]}\,\frac{[A]}{[A]+\beta} \qquad (2)$$

Inh = accepteur, inhibiteur ou sensibilisateur.

En 1954, G.O. Schenck et K.H. Ritter (3) ont étudié à l'aide de l'appareil photo-Warburg la cinétique de l'auto-oxydation de l'α-terpinène dans l'isopropanol sensibilisée par de la chlorophylle. Dans ce cas on s'est servi de cyclo-octatétraène et de *p*-benzoquinone comme inhibiteurs. Au cours de ces essais on a pu constater que les deux inhibiteurs

(*) Des états d'excitation biradicaux seul l'état de singlet n'est pas paramagnétique, à cause des spins anti-parallèles de tous les couples d'électrons. A l'état stationnaire des biradicaux formés par des moyens photochimiques, les états paramagnétiques de triplet l'emportent — à peu près en raison de leur durée de vie — sur les autres, aussi longtemps que d'autres partenaires de réaction ne sont pas présents en concentration suffisante.

peuvent désactiver le $Sens^{rad}$ = $chlorophylle^{rad}$; la *p*-benzo-quinone était d'une efficacité environ vingt fois plus grande que le cyclo-octatétraène.

Ces résultats furent confirmés en 1957 par R. LIVINGSTON (4), qui découvrit au moyen d'éclairs spectroscopiques une forte désactivation de la chlorophylle, qui est excitée à l'état de triplet, par l'O_2, la *p*-benzo-quinone et le cyclo-octatétraène. Conforformément à nos résultats, la *p*-benzo-quinone était sensiblement plus efficace que le cyclo-octatétraène.

A. — La désactivation du $Sens^{rad}$ par des inhibiteurs.

L'année dernière nous avons continué les recherches sur les réactions inhibitrices dans l'auto-oxydation photosensibilisée.

Dans les cas suivants on s'est servi comme accepteur d'α-terpinène qui est oxydé en ascaridol par photosensibilisation :

$$\text{α-terpinène} \xrightarrow[\text{dissolvant}]{+\ O_2/\text{Sens}/h\nu} \text{ascaridol}$$

α-terpinène — ascaridol

La formation de l'ascaridol monomère a servi de preuve qu'un transfert photosensibilisé de l'O_2 a eu lieu. Par contre l'auto-oxydation de l'α-terpinène thermique, non sensibilisée ou photo-induite par certains colorants a eu pour résultat des produits différents, pour la plupart polymères.

Nous avons utilisé le rose de bengale comme sensibilisateur dans le méthanol. Les mesures furent effectuées au moyen d'un dispositif de lampes d'immersion, où l'absorption de l'O_2 peut être enregistrée.

Nous avons utilisé comme inhibiteurs

1) le cyclo-octatétraène;
2) l'hydroquinone;
3) le benzidine;
4) la diméthyle-aniline.

Nous avons trouvé que le $Sens^{rad}$ peut être désactivé aussi par l'α-terpinène (= A). En comparaison avec les réactions de déactivation la désactivation spontanée de $Sens^{rad} \underset{k_4}{\rightarrow}$ Sens peut être négligée.

Les vitesses d'absorption de l'O_2, que nous avons mesurées, peuvent être représentées — en négligeant la réaction 4 — par l'équation (3).

$$v_{O_2} = + \frac{dAO_2}{dt} = I_{abs} \frac{1}{1 + K_A[A] + K_{Inh}[Inh]} \cdot \frac{[A]}{[A] + \beta} \quad (3)$$

Les constantes suivantes ont été déterminées par des expériences; $I_{abs} = 50$ ml quanta/mn = 0,134 mol quanta/h

$K_A = \frac{k_A}{k_2[O_2]} = 1{,}25$ l/mol [A] = conc. de l'α terpinène (mol/l)

$\beta = k_5/k_3 = 0{,}01$ mol/l

$K_{Inh} = \frac{k_{Inh}}{k_2[O_2]}$ (l/mol) [Inh] = conc. d'inhibiteur (mol/l)

$[O_2] = 1{,}057 . 10^{-2}$ mol/l

Inh :	cycloocta-tétraène	hydroquinone	benzidine	diméthyle-aniline
K_{Inh}	49,2	24.1	369,0	72,8
k_{Inh} :	($1{,}02 . 10^{10}$	$5{,}2 . 10^{9}$	$7{,}8 . 10^{10}$	$1{,}54 . 10^{10}$ l/mol.sec)

($k_2 = 2 . 10^{10}$, $k_A = k_{\alpha\ terpinène} = 2{,}6 . 10^{8}$ l/mol.sec)

k_2 fut estimé à l'aide de la théorie de la diffusion. Avec cette valeur on pouvait calculer les autres constantes des inhibiteurs — mises entre parenthèses ici — à partir des valeurs de K_{Inh}.

	cycloocta-tétraène	hydro-quinone	benzidine	diméhtyle-aniline	α-terpi-nène
$\frac{k_{Inh}}{k_2}$	0,51	0,26	3,90	0,77	0,013

TABLEAU I

	[A] = 0,147 mol/l				[A] = 0,305 mol/l				[A] = 0,621 mol/l			
[Inh] mol/l	$v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	$v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	$v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$
»	40,3	39,6	0,80	0,79	33,6	35,0	0,67	0,70	27,8	27,6	0,56	0,55
0,032	16,4	17,0	0,33	0,34	16,0	16,4	0,32	0,33	15,5	15,0	0,31	0,30
0,064	11,3	11,0	0,23	0,22	9,9	11,0	0,20	0,23	9,0	10,0	0,18	0,20
0,096	7,9	8,0	0,16	0,16	7,9	8,0	0,16	0,16	9,0	8,1	0,18	0,16

Inhibition de l'auto-oxydation de l'α-terpinène (= A) par le cyclo-octatétraène (= Inh), photosensibilisée par le rose de bengale (50 mg) dans 100 ml méthanol, HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

TABLEAU II

[Inh] mol/l	[A] = 0,147 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	[A] = 0,305 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	[A] = 0,621 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$
»	40,3	39,6	0,80	0,79	33,6	35,0	0,67	0,70	27,8	27,6	0,56	0,55
0,0318	23,4	24,0	0,47	0,48	22,0	22,5	0,44	0,45	21,2	19,5	0,43	0,39
0,0636	17,7	17,2	0,35	0,34	17,7	16,6	0,35	0,33	15,5	15,1	0,31	0,30
0,0954	13,3	13,4	0,27	0,27	12,2	13,0	0,24	0,26	12,2	12.0	0,24	0,24
0,1908	6,7	8,0	0,13	0,16	7,7	8,0	0,15	0,16	7,7	7,5	0,15	0,15

Inhibition de l'auto-oxydation de l'α-terpinène (= A) par l'hydroquinone (= Inh), photosensibilisée par le rose de bengale (50 mg) dans 100 ml méthanol, HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

TABLEAU III

[Inh] mol/l	[A] = 0,147 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	[A] = 0,305 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	[A] = 0,621 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$
»	40,3	39,6	0,80	0,79	33,6	35,0	0,67	0,70	27,8	27,6	0,56	0,55
0,002	24,4	23,2	0,49	0,47	22,2	22,9	0,44	0,46	19,9	19,5	0,40	0,39
0,004	17,8	17,6	0,36	0,35	16,7	16,9	0,33	0,34	14,4	15,3	0,29	0,31
0,008	12 2	11,4	0,24	0,23	10,0	11,1	0,20	0,22	10,0	10,5	0,20	0,21
0,032	2,2	3,6	0,04	0,07	2,2	3,6	0,04	0,07	2,2	4,0	0,04	0,08

Inhibition de l'auto-oxydation de l'α-terpinène (= A) par la benzidine (= Inh), photosensibilisée par le rose de bengale (50 mg) dans 100 ml méthanol, HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

TABLEAU IV

[Inh] mol/l	[A] = 0,143 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	[A] = 0,296 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	[A] = 0,604 mol/l $v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$
»	40,5	39,7	0,81	0,80	34,3	35,3	0,69	0,71	28,6	28,0	0,57	0,56
0,00495	29,9	30,4	0,60	0,61	27,3	27,3	0,55	0,55	25,6	23,2	0,51	0,46
0,0099	25,1	24,7	0,50	0,49	23,9	22,6	0,48	0,45	21,8	19,9	0,44	0,40
0,0198	18,0	17,7	0,36	0,35	17,1	16,7	0,34	0,33	16,3	15,3	0,33	0,31
0,0297	12,6	13,7	0,25	0,28	14,1	13,3	0,28	0,27	13,9	12,5	0,28	0,25
0,0396	10,5	11,5	0,21	0,23	10,8	11,4	0,22	0.23	9,4	10,6	0,19	0,21
0,0495	7,4	9,8	0,15	0,19	8,6	9,8	0,17	0,19	9,4	9,2	0,19	0,18

Inhibition de l'auto-oxydation de l'α-terpinène (= A) par la diméthyle-aniline (= Inh), photosensibilisée par le rose de bengale (50 mg) dans 100 ml de méthanol, HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

B. — La désactivation du $Sens^{red}$ par le Sens.

L'effet désactivant du sensibilisateur non-excité Sens sur le sensibilisateur excité $Sens^{red}$ a été examiné par nous dans le cas de 1,8-dihydroxy-anthraquinone. La *p*-benzoquinone s'est avérée, comme G. O. Schenck et K. H. Ritter (3) l'avaient déjà constaté, un inhibiteur très efficace de la synthèse de l'ascaridol photosensibilisée par la chlorophylle, le bleu de méthylène, l'éosine et le rubrène.

Quelques hydroxy-anthraquinones, surtout la 1,8-dihydroxyanthraquinone, se sont montrées d'excellents sensibilisateurs pour la formation de l'ascaridol dans la pyridine ou le méthanol alcalique.

En raison de leurs propriétés de quinone, les hydroxy-anthraquinones devraient avoir en outre des propriétés caractéristiques d'inhibiteurs.

La vitesse de réaction, dans ce cas la vitesse d'absorption de l'O_2, ne dépend normalement de la concentration du sensibilisateur que dans la mesure où une absorption totale des quanta de lumière irradiée ne s'est pas encore produite. Si l'on augmente la concentration du sensibilisateur au delà de celle nécessaire à l'absorption totale, la vitesse de réaction peut ou bien être indépendante de la concentration du sensibilisateur ou bien décroître, lorsque la concentration du Sens augmente.

Comme la zone de réaction photochimique diminue en grandeur, à mesure que la concentration du sensibilisateur augmente, une diminution de la vitesse

de réaction pourrait résulter de ce que la concentration nécessaire de l'O_2 n'est pas maintenue.

Cet effet peut pourtant être supprimé par un renouvellement de la zone de réaction photochimique, répété aussi souvent que nécessaire. Ceci a été le cas dans nos expériences.

Nous avons utilisé la 1,8-dihydroxy-anthraquinone comme sensibilisateur et l'α-terpinène comme accepteur dans la pyridine et nous avons déterminé les vitesses d'absorption de l'O_2 avec de l'oxygène pur et de l'air.

TABLEAU V

[Sens] mol/l	v_{O_2}obs. ml/mn	v_{O_2}cal. ml/mn	γ_{O_2}obs.	γ_{O_2}cal.	v_{air} obs. ml/mn	v_{air} cal. ml/mn	γ_{air} obs.	γ_{air} cal.
$1{,}0 . 10^{-3}$	30,7	31,4	0,79	0,80	18,8	20,2	0,48	0,52
2,5	29,5	30,1	0,76	0,77	17,5	17,9	0,45	0,46
5,0	27,5	28,2	0,71	0,72	16,5	15,2	0,42	0,39
7,5	25,3	26,4	0,65	0,68	14,0	12,7	0,36	0,33
10,0	23,4	24,8	0,60	0,64	10,8	11,1	0,28	0,28
20,0	19,2	20,0	0,49	0,51	7,0	7,4	0,18	0,19
50,0	14,1	13,0	0,36	0,33	3,8	3,8	0,10	0,10

Inhibition de l'auto-oxydation de l'α-terpinène (= 0,162 mol/l) par le Sens 1,8-dihydroxy-anthraquinone, dans la pyridine; HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

Les vitesses d'absorption de l'O_2 ont été calculées par les équations suivantes :

$$v_{O_2} = I_{abs} \frac{1}{1 + K_4 + K_A[A] + K_{Sens}[Sens]} \frac{[A]}{[A] + \beta} \quad (4)$$

$$v_{air} = I_{abs} \frac{1}{1 + 4{,}78(K_4 + K_A[A] + K_{Sens}[Sens])} \frac{[A]}{[A] + \beta} \quad (5)$$

$I_{abs} = 39$ ml quanta/mn $= 0{,}105$ mol quanta/h

$$K_4 + K_A[A] = \frac{k_1 + k_A[A]}{k_2[O_2]} = 0{,}13 \quad ([A] = 0{,}162 \text{ mol/l})$$

$$K_{Sens} = \frac{k_{Sens}}{k_2[O_2]} = 35{,}0 \text{ mol/l}$$

$\beta = k_5/k_3 = 0{,}01$ mol/l

$[O_2]_{air} = 0{,}209\ [O_2]$ oxygène pur

C. — La désactivation du $Sens^{rad}O_2$.

Jusqu'à ces derniers temps nous n'avons eu aucune indication qu'une désactivation du second produit intermédiaire, le $Sens^{rad}O_2$, par des inhibiteurs ou accepteurs selon la formule

$$Sens^{rad}O_2 + A \rightarrow Sens + O_2 + A$$

était possible.

G.O. Schenck et W. Müller ont cherché une telle réaction dans le travail de diplôme de W. Müller de 1955. Ils ont étudié des systèmes mixtes d'accepteurs, sans pourtant pouvoir obtenir une indication d'une telle déactivation.

Récemment nous avons trouvé, selon toute vraisemblance, une telle propriété d'accepteur dans la nicotine. De toute façon une telle interprétation tiendrait le mieux compte des résultats acquis jusqu'à présent.

Nous avons irradié la nicotine dans le méthanol avec le rose de bengale comme sensibilisateur et avec de l'oxygène pur et nous avons fait les constatations suivantes :

1) 1 mol de nicotine peut absorber trois mols de O_2.

2) La vitesse de réaction ne dépend de la concentration de nicotine que pour les concentrations $\leq 0{,}1$ mol/l.

Au-dessus de cette limite la vitesse de réaction reste paradoxalement constante.

3) La vitesse de réaction maximum (ou le rendement quantique) qu'on peut atteindre avec la nicotine n'est que 1/5 de celle qu'on peut atteindre au maximum avec l'α-terpinène.

TABLEAU VI

[α-Terp] mol/l	$v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	[Nicotine] mol/l	$v_{obs.}$ ml/mn	$v_{cal.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$
0,010	»	24,7	»	0,49	0,0208	3,7	2,9	0,07	0,06
0,147	40,3	39,6	0,80	0,79	0,0625	7,3	5,0	0,15	0,10
0,214	36,7	37,6	0,73	0,75	0,125	7,8	6,1	0,16	0,12
0,305	33,6	35,0	0,67	0,70	0,187	7,8	6,6	0,16	0,13
0,428	32,8	31,9	0,66	0,64	0,370	7,8	6,8	0,16	0,14
0,621	27,8	27,6	0,56	0,55	0,555	7,8	7,4	0,16	0,15

L'auto-oxydation *a*) de l'α-terpinène, *b*) de la nicotine, photosensibilisée par le rose de bengale (50 mg) dans 100 ml méthanol, HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

Ce résultat fut complètement inattendu. Selon les expériences que nous avons effectuées avec d'autres accepteurs, nous nous attendions à ce que la vitesse de réaction s'approche de celle mesurée avec l'α-terpinène, au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de la nicotine, ou bien qu'elle décroisse après avoir atteint un maximum. Ceci pourtant n'est pas le cas et ainsi une désactivation du $Sens^{rad}$ paraît exclue.

Comme d'autre part la nicotine n'agissait pas comme un filtre de lumière, la seule explication possible de la petite vitesse constante de réaction (et du rendement quantique) était une désactivation du $Sens^{rad}O_2$ par la nicotine.

La vitesse de réaction serait ainsi représentée par les équations (6) ou (7)

$$v_{O_2} = I_{abs} \frac{k_6[N]}{k_6[N] + k_7[N] + k_5} \qquad (6)$$

[N] = conc. de la nicotine

ou

$$v_{O_2} = I_{abs} \frac{[N]}{n[N] + \beta_N} \qquad (7)$$

$$Sens^{rad}O_2 + N \xrightarrow[k_6]{} \text{oxydation de la nicotine} + Sens$$

$$Sens^{rad}O_2 + N \xrightarrow[k_7]{} Sens + O_2 + N$$

$$n = (k_6 + k_7)/k_6 \quad \text{et} \quad k_5/k_6 = \beta_N$$

La vitesse de réaction maximum est ainsi :

$$v_{O_2,\,max} = I_{abs} \cdot \frac{1}{n} \qquad (n[N] \gg \beta_N). \qquad (8)$$

Comme I_{abs} = 50 ml quanta/mn, nous obtenons n = 6,4. Nous appelons le quotient $1/n$ le « quotient d'efficacité », car de 6,4 réactions élémentaires de la nicotine avec le $Sens^{rad}O_2$, il n'y a qu'une seule qui transfère de l'O_2 à la nicotine, alors que les 5,4 autres réactions élémentaires provoquent la décomposition du $Sens^{rad}O_2$ en Sens et O_2.

Si ces observations sont exactes, les vitesses de réaction pour l'oxydation photochimique combinée de l'α-terpinène et de la nicotine peuvent être calculées selon les équations suivantes :

$$v_{O_2} = I_{abs} \frac{k_2[O_2]}{k_2[O_2] + k_A[A]} \frac{k_3[A] + k_6[N]}{k_3[A] + (k_6 + k_7)[N] + k_5} \qquad (9)$$

ou

$$v_{O_2} = I_{abs} \frac{1}{1 + K_A[A]} \frac{1}{1 + \dfrac{n-1}{\dfrac{\beta_N}{\beta_A} \cdot \dfrac{[A]}{[N]} + 1} + \dfrac{1}{\dfrac{[A]}{\beta_A} + \dfrac{[N]}{\beta_N}}}$$

I_{abs} = 50 ml quanta/h (10)

$$K_A = \frac{k_A}{k_2[O_2]} = 1{,}25 \text{ l/mol}$$

$$n = 6{,}4$$

$$\beta_A = 0{,}01 \text{ mol/l}$$

$$\beta_N = 0{,}227 \text{ mol/l}$$

TABLEAU VII

[Nicotine] mol/l	[α-Terpinène] mol/l	$v_{obs.}$ ml/mn	$v_{calc.}$ ml/mn	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{calc.}$
	0,107	34,7	34,1	0,69	0,68
0,093	0,214	36,7	34,4	0,73	0,69
	0,428	35,4	30,4	0,71	0,61
	0,107	26,4	30,0	0,53	0,60
0,185	0,214	31,2	31,7	0,62	0,63
	0,428	29,1	29,0	0,58	0,58
	0,107	17,7	21,2	0,35	0,42
0,555	0,214	23,9	24,7	0,48	0,49
	0,428	25,2	24,8	0,50	0,50

L'auto-oxydation de l'α-terpinène + de la nicotine, photosensibilisée par le rose de bengale (50 mg) dans 100 ml méthanol; HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

Le cyclooctatétraène exerce, comme nous avons vu précédemment, un effet inhibiteur sur le $Sens^{rad}$. Si nous ajoutons du cyclooctatétraène à l'oxydation photosensibilisée de la nicotine, la vitesse de réaction doit se calculer de la façon suivante :

$$v_{O_2} = I_{abs} \frac{1}{1 + K_{COT}[COT]} \frac{[N]}{n[N] + \beta_N} \qquad (11)$$

Si nous ajoutons d'autre part du cyclooctatétraène à la photoxydation combinée de l'α-terpinène et de la nicotine, la vitesse de réaction doit être la suivante :

$$v_{O_2} = I_{abs} \frac{1}{1 + K_A[A] + K_{COT}[COT]} \cdot \frac{1}{1 + \dfrac{n-1}{\dfrac{\beta_N}{\beta_A} \cdot \dfrac{[A]}{[N]} + 1} + \dfrac{1}{\dfrac{[A]}{\beta_A} + \dfrac{[N]}{\beta_N}}} \qquad (12)$$

avec les valeurs indiquées ci-dessus pour I_{abs}, K_A, etc., et avec K_{COT} = 49,2 l/mol.

Dans le tableau VIII nous donnons quelques-unes des valeurs qui nous avons mesurées :

TABLEAU VIII

accepteur mol/l	sans COT $v_{obs.}$	$v_{cal.}$	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$	avec [COT] = 0,032 mol/l $v_{obs.}$	$v_{cal.}$	$\gamma_{obs.}$	$\gamma_{cal.}$
α-terpinène = 0,214	36,7	37,8	0,73	0,75	18,5	17,0	0,37	0,34
nicotine = 0,185	7,8	6,6	0,16	0,13	3,8	2,5	0,07	0,05
α-terpinène = 0,214 + nicotine = 0,185	31,2	31,7	0,62	0,63	16,4	11,9	0,33	0,30

L'auto-oxydation de l'α-terpinène, de la nicotine et de l'α-terpinène + de la nicotine sans et avec le cyclo-octatétraène (= COT) comme inhibiteur et avec le rose de bengale comme sensibilateur (50 mg) dans 100 ml méthanol, HQA 500; 15 °C; γ = rendement quantique.

BIBLIOGRAPHIE

1 *a*) G. O. Schenck — *Naturwissenschaften* 1948, **35**, 28.
b) G. O. Schenck — *Naturwissenschaften* 1953, **40**, 205, 229.
2) G. O. Schenck — *Angewandte Chemie* 1957, **69**, 569.
3) G. O. Schenck et K. H. Ritter — *Naturwissenschaften* 1954, **41**, 374.
4) E. Fujimori et R. Livingston — *Nature* 1957, **180**, 1036.

DISCUSSION

E. J. Bowen. — Les moloxydes intermédiaires AO_2' sont probablement des bi-radicaux. Les peroxydes cycliques stables AO_2 tels que le peroxyde d'anthracène ne peuvent se former que par des déformations considérables des molécules. La cinétique de la photoxydation de l'anthracène montre que AO_2' réagit avec une seconde molécule d'anthracène A pour donner AO_2. Comment cette interaction facilite-t-elle les déformations moléculaires compliquées qui sont nécessaires, cela reste un mystère. Est-ce qu'il faut admettre encore un intermédiaire de plus A — O —A?

T. Förster. — Dans notre laboratoire, Frink et Zügel ont étudié la photoxydation de la thiourée, de l'alkylthiourée et des composés dérivés sensibilisés par la thionine ou le bleu de méthylène. Ces systèmes sont intéressants car ils présentent, en l'absence d'oxygène, un blanchiment réducteur réversible du colorant par l'accepteur. C'est pourquoi, un mécanisme probable de la photoxydation sensibilisée pourrait être la réaction de blanchiment, suivie d'une ré-oxydation photochimique du sensibilisateur blanchi.

On a trouvé que, pour une concentration modérée d'accepteur, la consommation d'oxygène est nettement retardée puisqu'elle n'atteint pas son taux final avant un intervalle de temps de plusieurs minutes. En outre la concentration de l'état stationnaire du sensibilisateur est diminuée par une transformation partielle en sa forme leuco. Ces observations peuvent être considérées comme une indication que l'autre mécanisme possible mentionné ci-dessus pour les photoxydations sensibilisées par un colorant (qui a été formulé à l'origine par J. Weiss) pourrait bien jouer un certain rôle.

K. Gollnick. — Dans le cas de la synthèse photosensibilisée de l'ascaridol, de même que, par exemple, dans le cas de l'autoxydation photosensibilisée de l'ergostérol, le sensibilisateur excité ne fait que transférer l'oxygène à l'accepteur sans aucune déshydrogénation de l'accepteur.

Dans le cas de l'ergostérol et de l'éosine dans le méthanol, la pyridine, etc., on obtient, en l'absence d'oxygène et par irradiation de ce système, le forme leuco du colorant et de l'« ergopinacone »: le sensibilisateur excité déshydrogène l'ergostérol en un « radical-semi-ergopinacone » et deux de ceux-ci réagissent pour donner l'« ergopinacone ».

Mais si on travaille en présence d'oxygène, il ne se produit seulement qu'une formation de ergostérol-endoperoxyde sans aucune formation d'« ergopinacone » et de forme leuco du sensibilisateur.

N. R. Dhar. — Dans beaucoup de réactions d'oxydation à l'air, les peroxydes sont généralement les premiers produits. Ils réagissent avec les autres agents réducteurs présents dans le système et les oxydent. On observe donc dans les réactions de photoxydation et les réactions thermiques le phénomène de catalyse négative ou d'inhibition, lorsque des agents réducteurs sont également présents dans le système. Cette théorie a été donnée par N. R. Dhar et indépendamment par Moureu et Dufraisse en 1921. Il faut donc se souvenir de ce point de vue de l'oxydation des sensibilisateurs et des inhibiteurs lorsqu'on explique le mécanisme des photo-réactions et des photo-processus de même que les réactions thermiques. La possibilité d'oxydation des agents réducteurs joue un rôle important en modifiant le mécanisme de la réaction principale.

K. Gollnick. — Il est exact que les inhibiteurs tels que l'hydroquinone, la benzidine et la diméthyle-aniline sont oxydés lorsqu'on irradie longtemps, et la réaction se complique car il est possible que les inhibiteurs réagissent avec le peroxyde formé. Mais dans le cas du cyclo-octatétraène il n'y a pas d'oxydation photosensibilisée possible du cyclo-octatétraène avec les sensibilisateurs utilisés (éosine, rose de bengale, bleu de méthylène, etc.). (Nous avons essayé d'oxyder le cyclo-octatétraène par une réaction photosensibilisée, mais sans succès.) Donc la désactivation de $Sens^{rad}$ par le cyclo-octatétraène n'est due qu'à la réaction :

$$Sens^{rad}\ (\text{excité}) + COT \rightarrow Sens\ (\text{non excité}) + COT$$

En outre : nous avons mesuré les vitesses (ou rendements quantiques) de la réaction inhibée 5 et 10 mn après le début de l'irradiation; pendant cet espace de temps, on n'a pas observé d'oxydation des inhibiteurs utilisés.

E. Rabinowitch. — Les deux mécanismes de sensibilisation-formation d'un moloxyde et réduction réversible du sensibilisateur peuvent se rencontrer avec les différents sensibilisateurs. Par exemple, avec la thionine, le mécanisme de Weiss est le plus vraisemblable, tandis qu'avec l'anthracène et ses dérivés il se produit surtout une association réversible avec l'oxygène. Le cas de la chlorophylle est particulièrement intéressant parce que ce composé peut subir une photo-réduction réversible (Krassnovsky) aussi bien que la formation d'un moloxyde (Conant) et même une photoxydation réversible (Rabinowitch et Weiss); il peut donc entrainer des sensibilisations par trois mécanismes différents.

K. Gollnick. — Nous ne pensons pas que toutes les réactions d'autoxydation photosensibilisée puissent se produire uniquement par un transfert d'oxygène, sans une déshydrogénation de l'accepteur par le sensibilisateur excité.

A titre d'exemple, Karyakin a montré que la tétraline et le cumol sont oxydés par photosensibilisation en présence de certains dérivés de l'anthraquinone. Dans de tels cas l'accepteur est oxydé après que le sensibilisateur excité a déshydrogéné l'accepteur.

Cependant dans l'étude de Karyakin la 2-hydroxy-anthraquinone agissait comme sensibilisateur mais pas la 1-hydroxy-anthraquinone.

Par contre, dans notre étude sur la photosynthèse de l'ascaridol, la 1-hydroxy-anthraquinone agit comme sensibilisateur dans le méthanol alcalin ou la pyridine et la 2-hydroxy-anthraquinone ne le fait pas. Nous avons donc deux mécanismes différents de réactions d'autoxydation sensibilisée.

Dans le cas de la photosynthèse de l'ascaridol sensibilisée par la chlorophylle, nous devons supposer que l'α-terpinène est oxydé uniquement par un transfert d'oxygène sans aucune déshydrogénation par la chlorophylle excitée.

R. Livingston. — Certainement les autoxydations sensibilisées n'impliquent pas toutes le mécanisme d'un moloxyde labile. Ces réactions sensibilisées par les quinones sont sûrement d'un autre type, les intermédiaires étant des radicaux (semiquinones). On a des preuves que la chlorophylle agit en formant un moloxyde labile.

A. N. Terenin. — C'est un fait extrêmement intéressant qu'il existe une spécificité pour les OH substitués de l'anthraquinone en relation avec leur action comme transporteurs d'oxygène. Dans le cas de OH substitué en 1, le groupement OH est certainement lié au carbonyle par une liaison hydrogène, ce qui est impossible pour la substitution en position 2.

Je vous rappelle nos recherches avec Karyakin, qui datent de 1948-1950, où nous avons démontré que la fluorescence des dérivés de l'anthraquinone substitués en 1 n'est pas éteinte par l'oxygène, tandis qu'il y a une forte extinction pour les dérivés substitués en 2.

K. Gollnick. — Nous n'avons pas de théorie pour expliquer pourquoi les α-hydroxy-anthraquinones dans le méthanol alcalin ou la pyridine sont de bons sensibilisateurs pour la photosynthèse de l'ascaridol et pourquoi les β-hydroxy-anthraquinones ne le sont pas. Nous avons seulement trouvé que les corps suivants :

sont de bons sensibilisateurs dans le méthanol alcalin, tandis que ceux qui suivent :

ne sont pas des sensibilisateurs dans le méthanol alcalin pour la photosynthèse de l'ascaridol.

G. Porter. — L'effet obtenu n'est pas seulement une question de position; par exemple l'antraquinone-2-6-di-SO_3Na est un bon sensibilisateur mais pas le dérivé 2-6-dihydroxyle, le derivé 2-méthyl est un bon sensibilisateur mais pas le dérivé 2-amino.

PHOTO-REDUCTION ET PHOTO-OXYDATION SENSIBILISÉES PAR LES COLORANTS

par Gerald OSTER,

[*Polytechnic Institute of Brooklyn, Brooklyn I, N. Y., U. S. A.*]

Traduit par J. LAVOREL.

SOMMAIRE

Les réactions de photo-réduction et de photo-oxydation sensibilisées par les colorants ont une chose en commun : elles procèdent toutes par l'intermédiaire de l'état excité à longue vie du colorant. Seuls les colorants capables de photo-réduction (en présence d'agents réducteurs modérés) peuvent servir de sensibilisateur pour les photoxydations.

Le colorant photo-réduit est un agent réducteur puissant et peut, dans certains cas, réduire à l'obscurité l'agent réducteur oxydé formé pendant la réaction à la lumière. De tels systèmes réversibles pourraient servir de convertisseurs d'énergie solaire. Un système particulièrement commode consiste en une solution de proflavine avec de l'acide ascorbique comme agent réducteur. Un gramme de cette solution est capable de transformer en électricité la lumière solaire moyenne avec une puissance de un watt et un protentiel de un volt.

Introduction.

Au cours de ces quelques dernières années, la plus grande partie du travail de mon laboratoire a été consacrée à l'étude des propriétés photochimiques de colorants en solution aqueuse. En particulier, nous avons étudié la cinétique de la photo-réduction des colorants et des photo-autoxydations (oxydations par l'oxygène) sensibilisées par des colorants. J'aimerais résumer nos résultats et ajouter de nouvelles informations qui n'ont pas été publiées jusqu'à présent.

Bien que nos travaux aient été principalement consacré à l'aspect purement physico-chimique du problème, nous avons gardé présent à l'esprit la possibilité d'appliquer nos résultats à des problèmes biologiques, en particulier à la photosynthèse [1, 2, 3], au photopériodisme [3], à la photorestauration [3], à la vision [4], et à la photo-autoxydation biologique (« effet photodynamique ») [5]. Nous savons également que ces résultats sont applicables à la photographie sensibilisée par les colorants [6] et à la photographie par décoloration (bleach-out photography) [7]. En fait, au cours de nos travaux, nous avons découvert un nouveau type de photographie par polymérisation qui paraît avoir une importance technique considérable [8]. Dans le présent article, nous parlerons d'un système convertisseur d'énergie solaire fonctionnant à l'aide de colorants.

Photo-réduction.

On sait depuis longtemps que certains colorants en présence d'agents réducteurs modérés se transforment rapidement en leur forme leuco ou incolore lorsqu'on les illumine avec de la lumière visible [9, 10, 11]. L'addition d'électrons et/ou d'atomes d'hydrogène interrompt le long système conjugué du colorant de telle sorte qu'aucune absorption de lumière ne se produit plus au-dessus de 400 mμ. La réduction ne se produit pas à l'obscurité parce que l'agent réducteur est choisi de telle manière que cette réaction est thermodynamiquement impossible. Pour certains colorants du type acridine, la réduction à l'obscurité ne peut même se produire qu'en utilisant les agents réducteurs les plus puissants comme l'amalgame de sodium. Cependant, la réduction se produit à la lumière avec un rendement quantique égal à un en présence de corps très modérément réducteurs [12].

Nous avons étudié un certain nombre de colorants solubles dans l'eau pour voir s'ils étaient ou non photoréductibles. Tous les colorants du type fluorescéine (uranine, éosine, phloxine, etc.) [13], sont facilement photoréductibles, ainsi que les colorants du types thiazine (bleu de méthylène, azure A, vert de méthylène, etc.) [14]. Parmi les 17 colorants du type acridine que nous avons testés [12], toutes les 3,6-diaminoacridines (proflavine, euflavine, orange d'acridine, jaune d'acridine) [12] sont facilement photoréductibles, les 9 alkylaminoacridines donnent une

photoréduction plus lente, tandis que les mono-amino-, 2,6-diamino-, 2,7-diamino- ou 3,7,9-triamino-acridines ne sont pas capables de photoréduction. La riboflavine peut être photoréduite même sans addition d'agent réducteur; apparemment, c'est le groupe ribose dans le colorant qui joue ce rôle. Nous n'avons pas pu déceler la moindre photoréduction chez aucun des membres des classes suivantes de composés : colorants azo, azines, diphénylméthanes et triphénylméthanes. Nous avons pu déceler de petites modifications (spectrales) chez les porphyrines en illuminant des solutions aqueuses de ces substances en présence d'agents réducteurs modérés. Nous attribuons ces modifications spectrales à des photoréductions progressives ([15]).

La capacité d'un colorant d'être ou non photoréductible ne semble pas être liée à la présence de telle ou telle propriété structurale. Une condition nécessaire mais non suffisante pour que le colorant soit capable de photoréduction semble être qu'il présente quelque fluorescence. A cet gard, il est intéressant de remarquer que les colorants du type triphénylméthane, bien qu'ils ne soient pas photoréductibles à l'état libre en solution, le deviennent aisément lorsqu'ils sont fixés sur des polymères d'ordre élevé en solution ([2]). Le colorant fixé est fortement fluorescent alors que le colorant libre ne l'est pas. Cette propriété semble être caractéristique de nombreux colorants possédant des groupes capables de rotation (par exemple, les dérivés du stilbène, les di- et triphénylméthanes, etc.) ([16]). Plus récemment, nous avons trouvé que la fuschsine acide, colorant du type triphénylméthane, n'est photoréductible qu'en milieu visqueux où la fluorescence du colorant est appréciable ([17]).

Nombre de substances conviennent comme donneurs d'électrons pour la photoréduction des colorants. Parmi celles-ci, on compte des agents réducteurs tels que l'acide ascorbique, le glutathion, l'acide thioglycollique, la phénylhydrazine, l'hydrazine, la thiourée, l'allylthiourée, le glucose, le chlorure stanneux et le sulfate ferreux. De plus, des agents de chélation contenant des azotes secondaires ou tertiaires (par exemple, l'acide éthylène diamine tétra-acétique) peuvent également jouer le rôle de donneurs d'électrons pour la photoréduction ([14]). Ces composés ne sont pas des agents réducteurs au sens ordinaire du terme car il ne s'oxydent pas lorsqu'on fait passer un courant d'oxygène ans la solution pendant longtemps. Néanmoins, en présence de colorants appropriés, ils cèdent facilement des électrons au colorant photo-excité. La tendance à la cession d'électron dans la réaction photochimique augmente lorsque le pH croît; elle suit exactement la courbe de titration de l'agent de chélation comme fait également la variation en fonction du pH de sa capacité à fixer les ions métalliques par chélation.

États excités à longue vie.

Il y a plus de 30 ans, F. Perrin reconnut que des états excités à longue vie pourraient jouer un rôle dans les réactions photochimiques des colorants ([18]). Dans une série d'expériences exécutées par ses élèves ([19, 20]), il fut démontré que l'iodure de potassium, à de faibles concentrations insuffisantes pour inhiber la fluorescence de l'éosine mais suffisantes pour inhiber sa phosphorescence (d'une durée de vie de l'ordre de la milliseconde), inhibe la photo-décoloration de l'éosine dans le glycérol. Nous avons confirmé ces résultats et, de plus, nous avons établi que la photoréduction de tous les colorants procède par l'intermédiaire d'un état à longue vie.

Considérons d'abord le cas de la photoréduction de solutions aqueuses de fluorescéine ou d'un de ses dérivés halogénés en présence d'allylthiourée comme agent réducteur ([13, 14]). Le rendement quantique de la photoréduction obéit à la relation

$$\Phi = (A)/\alpha + \beta\,(A),$$

où α et β sont des constantes et (A) est la concentration de l'agent réducteur. Ce résultat est compatible avec l'idée que le colorant excité D^* peut soit retourner à l'état de base (avec émission de fluorescence et ou cession de chaleur au milieu environnant), soit réagir avec A. Ce dernier événement serait en compétition avec la fluorescence, mais on a trouvé que la variation de Φ avec A est beaucoup plus grande que ce à quoi on devrait s'attendre si A était seulement un inhibiteur de fluorescence. L'explication quantitative des résultats exige qu'il existe un état à longue vie du colorant D' et que D' (au lieu de D^*) réagisse avec A. Nous avons trouvé que de nombreuses substances à des concentrations aussi faibles que 10^{-6} M/l retardent de manière appréciable la photoréduction. On peut montrer par des arguments de diffusion que le ralentissement de réactions photochimiques ne pourrait se produire à des concentrations aussi faibles de la substance retardatrice que si l'espèce photo-activée réactive avait une durée de vie de l'ordre de 10^{-4} seconde. Cette durée est environ 10^5 fois plus grande que la durée de vie du premier état excité singlet. Les spectres des espèces excitées de la chlorophylle à longue vie en solution ont été déterminés par la technique des éclairs de grande intensité et cet état a été reconnu comme étant un état triplet ([22]).

Le colorant lui-même peut servir d'inhibiteur pour l'état à longue vie. C'est pourquoi le rendement quantique de la photo-réduction décroît lorsqu'on augmente la concentration du colorant. D'autre part, dans le cas des colorants fixés, le rendement quantique augmente lorsqu'on augmente la concentration du colorant ([2, 6]). Ici nous avons

trouvé qu'il était nécessaire de postuler qu'il y avait un échange rapide d'énergie (en 10^{-13} sec.) entre le colorant fixé excité et le colorant fixé dans l'état de base pour donner un état à longue vie.

Plus récemment, nous avons trouvé que la proflavine libre en solution possède un rendement quantique de photoréduction qui augmente avec la concentration du colorant suivant la relation $\Phi = (D)/\alpha + (D)$ et devient égal à l'unité pour des concentrations du colorant supérieures à environ 10^{-4} moles/litre [12]. Nous savons que l'état à longue vie est impliqué dans la réaction puisqu'une concentration de 10^{-6} moles d'aniline suffit pour réduire la vitesse à la moitié de sa valeur. Il n'y a pas de modification spectrale indiquant qu'il se produit une association du colorant, mais l'auto-inhibition de fluorescence est visible à des concentrations du colorant extrêmement faibles (10^{-6} M). Il semble que quelque sorte d'échange d'énergie se produit entre les molécules de colorants sur des distances assez grandes, suivant une idée initialement proposée par J. Perrin [23] [voir les références [24–27]].

Propriétés des colorants réduits.

Lorsque des colorants du type thiazine sont photoréduits en présences d'agents réducteurs modérés (autres que l'ion ferreux) la forme réduite est stable en absence d'oxygène. Si maintenant le système privé d'air est illuminé par de la lumière ultraviolette la forme leuco est ré-oxydée en la forme colorée normale. Le spectre d'action de la photo-restauration ne suit pas le spectre d'absorption de la forme leuco car l'illumination aux longueurs d'onde les plus courtes détruit irréversiblement la forme leuco [27a]. Le rendement quantique de la photorestauration est d'autant plus grand que la concentration en ions hydrogène est plus élevée [14].

La vitesse de la photodécoloration et de la photorestauration dépendent fortement de la viscosité du milieu [27a]. Les deux réactions sont ralenties lorsqu'on augmente la viscosité du milieu. Apparemment, des rencontres par diffusion entre le colorant excité (ou sa forme leuco) et le donneur (ou l'accepteur) d'électron ne sont pas assez fréquentes pendant la durée de vie de l'excitation lorsqu'on utilise des milieux visqueux. Cependant, nous avons récemment trouvé que des colorants du type thiazine sont aisément photoréductibles dans du verre de glucose pur (viscosité d'environ 10^{14} poise) [28]. Ici l'agent réducteur, le glucose, est en contact direct avec le colorant excité de telle sorte que la fréquence des rencontres est de l'ordre de 10^{-13} seconde et, par conséquent, le transfert d'électron peut aisément se produire pendant la durée de vie du colorant excité. Lorsqu'on irradie le verre photodécoloré avec du proche ultraviolet, au lieu d'obtenir la forme normale du colorant, on obtient un colorant rouge fortement fluorescent. Si l'on fait fondre le verre, l'espèce rouge se transforme en la forme leuco du colorant. Il est possible que la forme rouge soit une semi-quinone produite par oxydation partielle de la forme leuco, mais pas par réduction partielle de la forme normale; cependant nous n'avons pas exclu la possibilité d'une espèce triplet emprisonnée. Incidemment, l'irradiation du verre incolore avec les rayons X donne lieu à une coloration bleue, plutôt que rouge. Cette réaction est très sensible et des doses aussi petites que 5 roentgens peuvent être détectées de cette façon.

Les colorants photoréduits du type acridine sont des agents réducteurs puissants et peuvent dans certains cas réduire l'agent réducteur oxydé formé pendant le processus de photoréduction. De cette manière, la proflavine en présence d'acide ascorbique peut servir de système réversible pour la transformation de la lumière visible en énergie électrique (comparer avec les références 29, 30, 31). Le système acridine est particulièrement commode pour le cas de l'énergie solaire car on peut produire des différences de potentiel de un volt avec un rendement quantique élevé. Ce système comporte également cette particularité que, puisque le rendement quantique reste élevé même à des concentrations relativement grandes du colorant, il suffit seulement d'utiliser des couches très fines de solution. Nous estimons qu'un système pesant un gramme doit produire à partir d'intensités solaires moyennes un watt d'énergie électrique.

Les acridines photoréduites sont aussi capables de réduire une grande variété de substances chimiques, par exemple, des aldéhydes et des composés nitro. La réduction du nitrobenzène en aniline par cette méthode semble être plus sélective qu'en employant les méthodes ordinaires chimiques ou électrolytiques et les réactions secondaires habituelles n'apparaissent pas [12].

La forme réduite de presque tous les colorants réagit avec l'oxygène pour reformer le colorant initial et produire de l'eau oxygénée. Des radicaux libres se forment pendant ce processus et peuvent déclencher la polymérisation de composés vinyliques [8]. Si la photoréduction est conduite en présence du monomère mais en absence rigoureuse d'oxygène, le colorant sera réduit mais il ne se produira pas de polymère. Si maintenant on admet l'oxygène à l'obscurité, il en résulte une polymérisation. Il est donc clair que la production de radicaux libres est le résultat de la réactions de la forme leuco avec l'oxygène. La photopolymérisation sensibilisée par les colorants est un moyen d'amplifier l'effet de la lumière; des rendements quantiques attei-

gnant un milliard, en terme de conversion du monomère, ont été obtenus par de tels systèmes ([32]).

Photo-oxydations.

Les photo-autoxydations sensibilisées par des colorants de substrats biologiques ([33]) et organiques de synthèse ([34]) ont été réalisées depuis de nombreuses années. Le fait que la réaction dépend de la concentration de l'oxygène seulement à des concentrations extrêmement faibles de ce corps (environ 10^{-6} M) indique certainement l'intervention d'un état à longue vie ([34, 35, 36, 37]). De petites quantités d'agents réducteurs inhibent la réaction.

Nous avons étudié les photo-autoxydations en détail ([38]) avec la *p*-phénylènediamine comme substrat autoxydable, car cette substance subit des modifications de couleur au cours des différentes étapes de l'oxydation et il est donc possible de suivre la réaction par une méthode colorimétrique. Nous avons trouvé que seuls les colorants capables d'être photoréduits (en présence d'agents réducteurs modérés) peuvent jouer le rôle de sensibilisateur pour la photo-autoxydation. De plus, nous avons constaté que, tandis que l'oxygène inhibe fortement l'état excité à longue vie du colorant, le substrat (ici la *p*-phénylènediamine) ne l'inhibe pas au même degré. Nous en concluons que le colorant dans l'état à longue vie réagit avec l'oxygène pour former un peroxyde qui, à son tour, oxyde le substrat avec régénération du colorant. Ce schéma est conforme à celui qu'a proposé Schenck ([39]). Ceci illustre le rôle critique de l'état à longue vie dans la photo-oxydation et dans la photoréduction.

BIBLIOGRAPHIE

(1) G. Oster. — *Research in Photosynthesis* (H. Gaffron et al., éditeurs) Interscience Publishers, New-York, 1957.
(2) G. Oster et J. S. Bellin. — *J. amer. chem. Soc.*, 1957, **79**, 294.
(3) G. Oster. — *Proc. Int. Symp. on Periodism in Plants and Animals*, 1957. sous presse.
(4) G. Oster. — *Conference on Photoreception*, New-York Academy of Sciences, 1958. Sous presse.
(5) G. Oster et R. Kimball. — A paraître.
(6) J. S. Bellin et G. Oster. — *J. amer. chem. Soc.*, 1957, **79**, 2461.
(7) G. Oster. — *Photo. Engin.*, 1953, **4**, 173.
(8) G. Oster. — *Nature*, 1954, **173**, 300.
(9) M. Mudrovcic. — *Zeits. wiss. Photo.*, 1928, **26**, 171.
(10) K. Weber-Zeits. — *Physik. Chem.*, 1931, **B 15**, 18.
(11) G. Hoslst-Zeits. — *Physik. Chem.*, 1934, **B 169**, 9.
(12) G. Oster et F. Millich. — A paraître.
(13) A. H. Adelman et G. Oster. — *J. amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 3977.
(14) G. Oster et N. Wotherspoon. — *J. amer. chem. Soc.*, 1957, **79**, 4836.
(15) Cf. A. A. Krasnavsky et G. P. Brin. — *Doklady Akad. Nauk U.R.S.S.*, 1949, **67**, 325.
(16) G. Oster et Y. Nishijima. — *J. amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 1581.
(17) G. Oster et J. Dubien. — A paraître.
(18) F. Perrin. — *C.R.*, 1927, **184**, 1121.
(19) M. Privault. — *C.R.*, 1927, **184**, 1120.
(20) S. Boudin. — *J. Chim. Phys.*, 1930, **27**, 285.
(21) G. Oster et A. H. Adelman. — *J. amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 913.
(22) R. Livingston et V. Ryan. — *J. amer. chem. Soc.*, 1953, **75**, 2176.
(23) J. Perrin. — *Deuxième conseil chim. Solvay*, Gauthier-Villars, Paris, 1925, p. 322.
(24) H. Kallmann et F. London. — *Zeits. physik. Chem.*, 1928, **B 2**, 207.
(25) F. Perrin. — *Ann. Physique*, 1932, **17**, 283.
(26) S. I. Vavilov. — *Mikrostruktura Svela*, Izd. Akad. Nauk U.R.S.S., Moscou, 1950, Part. 4.
(27) T. Förster. — *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*, Vandenhoeck and Ruprecht, Gottingen, 1951, chap. 9.
(27 *a*) G. Oster et N. Wotherspoon. — *J. Chem. Phys.*, 1954, **22**, 157.
(28) G. Oster et B. Broyde. — A paraître.
(29) E. I. Rabinowitch. — *J. Chem. Phys.*, 1940, **8**, 551.
(30) V. B. Evstigneev et A. N. Terenin. — *Doklady Akad. Nauk U.R.S.S.*, 1951, **81**, 223.
(31) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova, *Doklady Akad. Nauk U.R.S.S.*, 1953, **81**, 1105.
(32) G. K. Oster, G. Oster et G. Prati. — *J. amer. chem. Soc.*, 1957, **79**, 595.
(33) O. Raab. — *Zeits. Biol.*, 1900, **39**, 524.
(34) H. Gaffron. — *Biochem. Zeits.*, 1933, **264**, 251.
(35) A. N. Terenin. — *Acta Physicochim. U.R.S.S.*, 1943, **18**, 210.
(36) J. Weiss. — *Symp. Soc. Dyers and Colourists*, Manchester, 1949, p. 135.
(37) J. D. Knight et R. Livingston. — *J. Phys. Colloid Chem.*, 1950, **54**, 703.
(38) G. Oster et M. Schrader. — A paraître.
(39) G. O. Schenck. — *Naturwiss.*, 1948, **35**, 38.

DISCUSSION

M. Magat. — Je voudrais poser deux questions :

1) Si la réaction expliquant l'augmentation de rendement de proflavine avec la concentration est la réaction

$$D^* + D \rightarrow D' + D$$

je ne vois pas comment la fixation du colorant sur un polymère peut la favoriser. S'agit-il dans ces cas de la même réaction?

2) La longueur de chaînes cinétiques dans la polymérisation est en général de l'ordre de 10^{-5}-10^{-6}. Dans quelles conditions avez-vous obtenu des rendements de l'ordre de 10^9?

G. Oster. — 1) Selon des études d'adsorpiton (par dialyse en utilisant l'isotherme de Langmuir) nous trouvons qu'il y a en moyenne environ une molécule de colorant pour dix unités monomères du substrat haut polymère. Certaines molécules de colorant peuvent cependant être réellement en contact étroit, en raison des configurations que la chaîne polymérisée peut prendre en solution.

2) La valeur élevée de la longueur de chaîne que j'ai indi-

quée a été obtenue en augmentant la viscosité du milieu si bien que la terminaison de la chaîne est supprimée.

E. C. Wassink. — Je voudrais vous demander si j'ai raison de supposer que dans le cas de la proflavine D* est l'état fluorescent et l'état de longue durée de vie D′ est l'état photo-réducteur. Dans l'affirmative, comment expliquer le parfait antiparallélisme entre le rendement de fluorescence et le rendement de photoréduction?

En photosynthèse, j'ai du mal à voir comment, si la « chimie » débutait à partir de l'état triplet de la chlorophylle, comme on l'admet parfois, il pourrait y avoir des relations définies entre l'intensité de la fluorescence et la vitesse de photosynthèse (soit anti-parallélisme soit toute autre sorte de relation définie trouvée) puisque les durées de vie des deux états (D* et D′) sont si différentes.

G. Oster. — Supposons que D* ait une interaction avec D et donne l'espèce D′ active chimiquement et de longue durée de vie. Il est clair que cette interaction fait concurrence à la fluorescence et en même temps augmente le photoréduction. Les différences de durées de vie de D* et D′ ne sont pas directement impliquées dans cette question.

A. N. Terenin. — Est-ce que l'action du polymère fixant à sa surface un colorant est simplement celle d'un milieu rigide, qui confère une planarité à la molécule, ou est-ce une action spécifique? Avez-vous obtenu une action similaire avec des adsorbants minéraux comme le gel de silice? Nous avons observé que la phtalocyanine-Mg adsorbée sur un gel de silice ne donne pas la photo-réduction réversible de Krasnovsky, observée initialement dans la même solution.

G. Oster. — Nous n'avons fait aucun essai avec les absorbants non organiques. Comme vous l'avez suggéré, j'essaierai le gel de silice.

G. M. Wyman. — Je voudrais ajouter à la question de A. N. Terenin que nous avons effectué quelques travaux sur les colorants thio-indigo adsorbés sur SiO_2 et que nous avons trouvé qu'ils présentaient des colorations tout à fait différentes de celles obtenues lorsqu'on les dissolvait dans des milieux plastiques tels que les polystyrènes ou les polyméthylméthacrylates. Ceci suggère que dans ces conditions on a affaire à une espèce tout à fait différente, tout au moins dans le cas de ces colorants.

E. Rabinowitch. — Dans l'étude de l'effet « photodynamique » on a suggéré une association quasi-absolue entre la fluorescence d'un colorant et son activité photodynamique. De même, d'autres chercheurs ont postulé que la sensibilisation n'a lieu que par l'intermédiaire de l'état triplet. E. C. Wassink pense, au contraire, qu'en photosynthèse, seul l'état de singlet excité intervient, en raison de l'anti-parallélisme du taux de la fluorescence et de la photosynthèse. A mon avis, toutes ces généralisations sont trop « dogmatiques ». Dans certaines conditions, les colorants non fluorescents peuvent servir de sensibilisateurs aussi bien que les colorants fluorescents; si les molécules à l'état singlet excité ont la chance de rencontrer le substrat de la réaction photochimique, elles peuvent réagir directement sans transformation préalable en état triplet; et l'antiparallélisme de la photosynthèse et de la fluorescence chlorophyllienne *in vivo* peut être interprété sans postuler une compétition directe entre fluorescence et photochimie pour le même état excité.

G. Oster. — Nous avons trouvé un strict parallélisme entre la photoréductibilité d'un colorant et son aptitude à servir comme photosensibilisateur pour l'effet photodynamique. De plus il y a une autre propriété qui semble liée à ceci : le colorant devient phosphorescent dans un milieu rigide. Le fait que le colorant soit ou non fluorescent ne semble pas avoir de l'importance.

E. C. Wassink. — E. Rabinowitch a fait remarquer que mes affirmations étaient probablement basées sur l'anti-parallélisme souvent observé entre l'intensité de fluorescence et la vitesse de la photosynthèse, mais cela ne se produit pas toujours.

Je dois rappeler que notre groupe a été parmi les premiers à établir nettement que cet antiparallélisme ne s'observe pas toujours. La condition pour que cet antiparallélisme existe est que les réactions impliquant des accepteurs d'énergie primaires limitent la vitesse de la photosynthèse. On pourrait donc expliquer ainsi dans de nombreux cas les déviations à cet anti-parallélisme.

Ce que je voulais établir, c'était que, puisque la durée de vie de D′ est tellement plus grande que celle de D* que le premier constituerait une sorte de « fosse », ou « pool » si vous préférez, pour l'énergie qui amplifierait considérablement tout « effet de retour » possible de la « chimie » à D*. Mais cette idée peut très bien être fausse et j'aimerais bien avoir votre avis à ce sujet!

Enfin je voudrais dire, d'accord avec vous, que ce que vous appelez « impureté » correspond probablement à ce que les biologistes (en photosynthèse) appellent « accepteur d'énergie » et ce qui, photographie sensibilisée, joue le rôle de « super-sensibilisateur ».

A. Szent-Gyorgyi. — Nous avons observé que la riboflavine, dans une solution aqueuse congelée, passe facilement dans un état phosphorecent à longue durée de vie, Ainsi, dans ce cas, votre réaction

$$D^* + D = D' + D \qquad (1)$$

pourrait s'écrire

$$D^* + O_2 = D' + O_2 \qquad (2)$$

Nous avons pensé que O_2 agit en créant une perturbation magnétique, puisqu'il est paramagnétique. Je me demande si votre réaction (I) ne pourrait s'expliquer en supposant que D* se transforme spontanément en D′ et que D′, étant paramagnétique, augmente la transition des autres D* en D′?

G. Oster. — Nos études cinétiques sont interprétées par la vitesse de production de l'état métastable D′, comme l'indique la vitesse de photoréduction du colorant.

Comme nous n'avons que très peu d'informations spectrales, nous ne sommes pas en mesure d'établir si, oui ou non, plus d'un état métastable est impliqué.

H. P. Kallman. — La très importante réaction

$$D^* + D \rightarrow D' + D,$$

que vous avez proposée en raison de la dépendance de vos effets avec la concentration, est supposée ne se produire qu'entre deux molécules qui sont très voisines l'une de l'autre. Au lieu de supposer une diffusion de D, on peut aussi supposer qu'un certain nombre de molécules D sont assez voisines pour en attraper une autre et permettre à la réaction ci-dessus de

se produire. Ce nombre augmentera avec la concentration. On obtient donc ainsi pour les molécules D fixées de façon rigides un accroissement de rendement avec la concentration seulement si la concentration dans la couche d'absorption est assez élevée. C'est pourquoi il serait très intéressant de connaître cette concentration.

G. Oster. — Ces interactions se produisent pour des concentrations comprises entre 10^{-5} et 10^{-6} molaire et par suite agissent sur des centaines d'Angstroms.

L'effet ne dépend pas de la température et par conséquent les dimères ne sont pas impliqués. L'effet ne dépend pas de la viscosité et par conséquent la diffusion n'est pas impliquée. D'après votre question je suppose que vous pensez à une certaine période de fortes concentrations (relatives) locales dues à des fluctuations.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SUR LE SPECTRE D'ABSORPTION ET LE SPECTRE D'ACTION DE FLUORESCENCE DE SUBSTANCES ORGANIQUES EN SOLUTION

par Jean LAVOREL,

Chargé de Recherches au C. N. R. A.
Station Centrale de Physiologie Végétale, Versailles.

SOMMAIRE

La forme du spectre d'action de fluorescence de colorants organiques dépend de leur concentration dans la solution. En particulier, le déclin bien connu du rendement de fluorescence, à droite de la bande d'adsorption correspondant au premier niveau excité, est absent dans les solutions diluées et n'apparaît que lorsque la concentration augmente. L'effet s'explique quantitativement par la théorie du dimère non fluorescent. Quelques conséquences de la dimérisation sont envisagées.

Introduction.

On sait, principalement depuis les travaux de Vavilov (1), que le rendement quantique de fluorescence des colorants organiques en solution est indépendant de la longueur d'onde de l'excitation. Cependant, cette loi souffre une exception remarquable pour les longueurs d'onde supérieures à une valeur correspondant à peu près à la position de la dernière bande d'absorption, voisine de la bande de fluorescence. Par longueurs d'onde croissantes — à droite du maximum d'absorption —, on constate que le rendement décroît rapidement jusqu'à zéro.

Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer cette particularité.

Un premier type d'hypothèse fait appel à une propriété moléculaire *intrinsèque*, c'est-à-dire partagée par toutes les molécules indistinctement. Selon Jablonski (2), ce domaine de longueurs d'onde correspondrait à une transition électronique « interdite » portant la molécule dans un état métastable non fluorescent; d'une manière analogue, Neporent et coll. (3) ont proposé plus récemment de considérer une bande vibratoire partiellement recouverte par la bande d'absorption électronique.

Un second type d'hypothèse consiste à admettre que l'absorption dans le domaine de longueurs d'onde où le rendement décroît est dû à la présence de *molécules non fluorescentes* dont le spectre d'absorption ne coïnciderait pas avec celui des molécules normales. Selon Förster (4), ce rôle serait joué par une forme dimère en équilibre avec la forme monomère du colorant. Cette hypothèse repose sur les résultats expérimentaux de Rabinowitch et Epstein (5) sur la dimérisation de certains colorants en solution et sur les modifications spectrales qui en résultent.

Nous avons été amené à étudier le rendement de fluorescence de la fluorescéine en solution alcaline aqueuse en fonction de la longueur d'onde d'excitation et pour différentes concentrations. Nous avons constaté que :

1° en solution extrêmement diluée, le rendement quantique restait parfaitement constant en fonction de la longueur d'onde, même dans la région où le déclin de rendement avait été antérieurement observé.

2° au fur et à mesure qu'on augmentait la concentration, le déclin de rendement dans la région ci-dessus apparaissait et s'accentuait et que, à gauche du maximum d'absorption, un minimum de rendement se développait parallèlement.

Cette influence de la concentration sur les anomalies du spectre d'action de fluorescence infirme totalement toute hypothèse du premier type; par contre, nous nous proposons de démontrer que l'hypothèse de Förster explique quantitativement ce phénomène. Nous ferons état d'observations portant sur d'autres colorants qui tendent à établir la validité générale de cette explication et nous en tirerons quelques conclusions concernant différentes questions, dont celle de l'auto-inhibition de fluorescence.

Méthode.

Si l'hypothèse du dimère est vérifiée, la seule cause de variation du rendement quantique de

fluorescence en fonction de la longueur d'onde λ doit être la distribution, variable en fonction de λ, des photons absorbés entre les formes monomère et dimère du colorant. Plus précisément, si l'on appelle $\Phi(\lambda, c)$ le rendement en fonction de λ pour une valeur c de la concentration du colorant et, d'autre part, $A_m(\lambda, c)$ l'absorption *relative* du monomère dans les mêmes conditions, c'est-à-dire le rapport de la quantité de lumière absorbée par le dimère à la quantité de lumière absorbée par l'ensemble des deux formes, on doit avoir pour c donné :

$$\Phi(\lambda, c) = A_m(\lambda, c) \times Q(c) \qquad \text{(I)}$$

où $Q(c)$ est indépendant de λ.

1. *Rendement de fluorescence.* — La lumière d'excitation provenait d'un monochromateur à réseau Bausch et Lomb ($f = 250$ mm, 6,6 mμ par mm de fente) dont les fentes étaient d'ordinaire réglées à 1 mm ou moins. Une cuve de 0,6 cm d'épaisseur contenant la solution à étudier recevait la lumière monochromatique et la fluorescence était mesurée à l'aide d'un photomultiplicateur R. C. A. (nº 6217) derrière un filtre convenable isolant la partie non-réabsorbable de la bande de fluorescence (pour la fluorescéine : Corning nº 3481; pour la thionine : Corning nº 2030). Eventuellement, une correction était faite pour tenir compte de l'absorption incomplète du faisceau excitateur par la solution; mais les domaines de variation de c et de λ étaient tels que cette correction était toujours faible, sinon négligeable. La connaissance en valeur relative de la courbe d'émission du système monochromateur-lampe permettait de calculer une valeur relative de $\Phi(\lambda, c)$.

2. *Spectre d'absorption.* — Comme c était susceptible de varier jusqu'à des valeurs de l'ordre de 10^{-2} M, les techniques habituelles de mesures des spectres d'absorption n'étaient plus applicables. Dans ces conditions, nous avons utilisé une microcuvette constituée de deux plaques de verre appliquées l'une sur l'autre avec interposition d'un cadre de mica d'épaisseur convenable (moyennant quelques précautions, on peut descendre juqu'à des épaisseurs de l'ordre de 5 μ); l'espace ainsi défini était occupé par la solution à étudier. Les quatre faces non optiques du bloc obtenu après assemblage étaient recouvertes de paraffine fondue afin d'en maintenir les parties ensemble. Les dimensions du bloc étaient telles qu'il pouvait aisément se loger à la place d'une cuve ordinaire dans un spectrophotomètre Beckman DU.

Il est évident, étant donné l'incertitude sur l'épaisseur de la microcuvette, qu'on ne pouvait espérer obtenir une valeur absolue du coefficient d'absorption à partir de la densité optique mesurée, $D(\lambda, c)$. Néanmoins, on verra qu'une connaissance en valeur relative de $A_m(\lambda, c)$, suffisante pour notre propos, peut facilement se déduire des mesures de D. L'expression exacte de $A_m(\lambda, c)$ est :

$$A_m(\lambda, c) = \frac{x\varepsilon_m}{x\varepsilon_m + \frac{1}{2}(1-x)\,\varepsilon_d}$$

avec : x = fraction molaire de la forme monomère à la concentration globale c.

ε_m et ε_d = coefficients d'absorption des formes monomère et dimère respectivement.

x obéit à la relation :

$$\frac{\frac{1}{2}(1-x)}{x^2} = Kc$$

où K est la constante d'association de l'équilibre monomère-dimère.

Or, en remarquant que pour c tendant vers zéro seule la forme monomère est présente en solution, on voit que :

$$\frac{D(\lambda, 0)}{D(\lambda, c)} = A_m(\lambda) B(c)$$

où $D(\lambda, 0)$ est la densité optique de référence (à la concentration de 10^{-5} M) mesurée dans une cuve de 1 cm d'épaisseur et $B(c)$ est un facteur dépendant seulement de c et de l'épaisseur (inconnue) de la microcuvette.

3. *Comparaison de Φ et de A_m.* — Un moyen commode pour comparer ces deux quantités, connues à des facteurs près indépendants de λ, consiste à porter en ordonnée leurs valeurs logarithmique en fonction de λ en abscisse. Si la relation (I) s'applique, on doit pouvoir amener les courbes log Φ et log A_m correspondantes à coïncider par une translation suivant l'axe des ordonnées.

4. *Colorants.* — La fluorescéine (Eastman Kodak Co.) était en solution alcaline aqueuse (NaOH I M). La thionine (Hartman et Leddon) était en solution aqueuse. La chlorophylle [préparée et cristallisée suivant la méthode de Jacobs et coll. [6]] était en solution dans l'huile de paraffine.

Résultats.

La figure 1 donne le résultat de la comparaison de Φ et de A_m pour la fluorescéine à différentes concentrations. On voit que ces résultats confirment d'une manière satisfaisante l'hypothèse du dimère. La figure 2 montre la forme et l'intensité relative des bandes d'absorption du monomère et du dimère. On remarquera que le passage à la forme dimère s'accompagne de l'apparition de deux bandes D_1

et D_2 situées de part et d'autre de la bande M de la forme monomère (*).

La même comparaison relative à la thionine à la concentration de 2,5 10^{-3} est illustrée dans

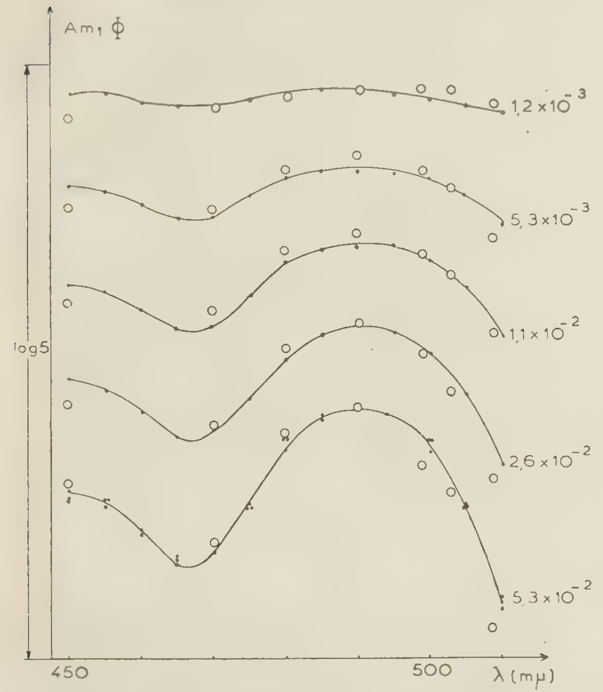


Fig. 1. — Comparaison des variations de A_m (points noirs et courbes) et de Φ (cercles vides) en fonction de λ pour la fluorescéine en solution aqueuse NaOH 1 M à différentes concentrations du colorant (indiquées en mole 1^{-1} en regard des courbes correspondantes).

la figure 3. Dans ce cas, nous nous sommes contenté de calculer A_m d'après les résultats de Rabinowitch et Epstein ([5]). On voit que l'accord est satisfaisant. Nous avons calculé, également d'après les résultats de ces auteurs, le spectre d'absorption du dimère et constaté qu'il était caractérisé par l'apparition de deux nouvelles bandes, comme dans le cas de la fluorescéine.

Discussion.

La dimérisation des colorants organiques en solution concentrées semble être un phénomène très général lié à la présence d'une forte bande d'absorp-

(*) Le spectre d'absorption de la forme dimère a été calculé à partir des courbes de $Am(\lambda, c)$, moyennant certaines hypothèses simplificatrices. Une étude plus précise des spectres d'absorption de solutions concentrées de colorants organiques, portant notamment sur la fluorescéine, a été publiée par Förster et König ([7]) à l'époque où nous terminions ce travail : elle confirme l'existence des bandes D_1 et D_2.

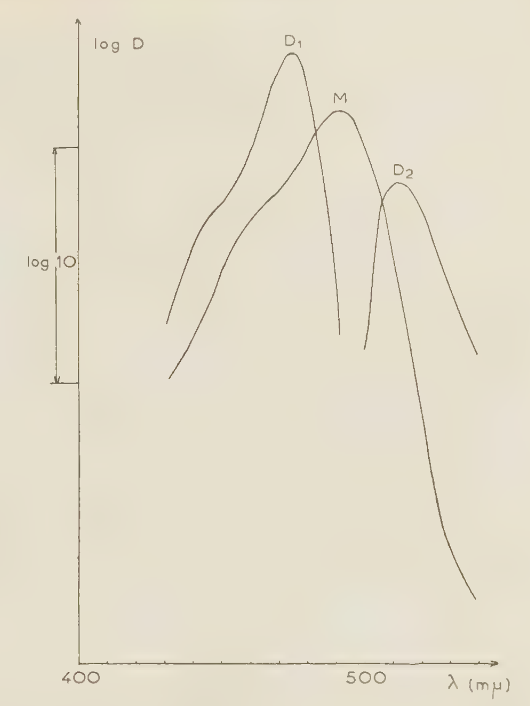


Fig. 2. — Bandes d'absorption de la forme monomère (M) et de la forme dimère (D_1 et D_2) de la fluorescéine en solution alcaline aqueuse. L'échelle des ordonnées est logarithmique, l'unité de densité optique est arbitraire.

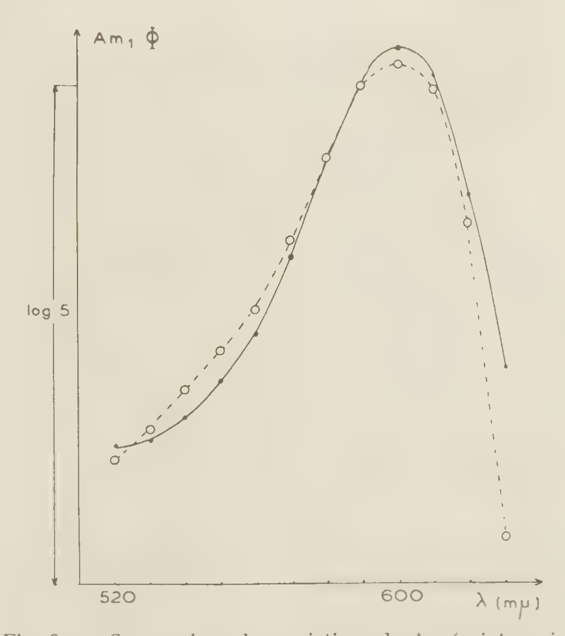


Fig. 3. — Comparaison des variations de A_m (points noirs et courbe en trait plein) et de Φ (cercles vides et courbe en tirets) en fonction de λ pour la thionine en solution aqueuse à la concentration de 2,5 10^{-2} M.

tion située vers les grandes longueurs d'onde. Son interprétation théorique fait intervenir les forces de dispersion de London [8, 9] qui dans ce cas peuvent atteindre des valeurs considérables. L'apparition des bandes D_1 et D_2 a été prévue et interprétée par FÖRSTER [4] sur la base d'un combinaison des moments dipolaires associés à la transition électronique des deux éléments du dimère. Cependant, FÖRSTER estimait que la bande D_2, qui correspond à une orientation anti-parallèle des moments dipolaires, devait avoir une intensité négligeable. Nos résultats suggèrent qu'en réalité il n'en n'est pas ainsi et que, en conséquence, cet anti-parallélisme est loin d'être parfait. On peut penser que les forces intermoléculaires de dispersion ne sont pas assez importantes pour imposer un strict anti-parallélisme en présence de différentes influences contraires (fluctuations, facteur stérique, actions électrostatiques).

Une autre conséquence de la dimérisation des solutions concentrées de colorants organiques avait déjà été envisagée en 1889 par WALTER [10], qui pensait que l'auto-inhibition de fluorescence, ou diminution du rendement de fluorescence aux fortes concentrations, devait pouvoir s'expliquer par une participation croissante de la forme dimère non fluorescente à l'absorption. Nous venons de voir que cette idée rend parfaitement compte de la variation du rendement de fluorescence en fonction de λ pour les solutions assez concentrées; mais elle n'explique pas entièrement la variation du rendement en fonction de la concentration [5]. Dans le cas de la fluorescéine par exemple, nos résultats nous permettent d'estimer qu'à la concentration de $5\ 10^{-2}$ M, où le rendement de fluorescence tombe à moins de 1 % de sa valeur en solution diluée, le rapport monomère/dimère est encore de l'ordre de 4. Comme les valeurs absolues des coefficients d'absorption des deux formes sont en moyenne du même ordre de grandeur, on voit que la contribution de la forme dimère n'est pas suffisante pour expliquer la diminution du rendement. Différentes propriétés des solutions fluorescentes ont suggéré à plusieurs auteurs l'intervention du mécanisme de transferts par résonance dans le phénomène d'auto-inhibition de fluorescence [VAVILOV [11], F. PERRIN [12], FRANCK et LIVINSGTON [13], FÖRSTER [4]]. L'hypothèse la plus féconde nous paraît être celle qui a été initialement proposée par F. PERRIN. Par le jeu des transferts, l'excitation électronique peut visiter pendant l'intervalle de sa durée de vie un certain nombre de molécules. Dans ces conditions, une proportion même faible de molécules de dimères suffit pour que la plupart des chaînes de transferts se terminent dans les dimères-pièges avant que l'émission de fluorescence ait eu le temps de se produire. Nous voudrions attirer l'attention sur une conséquence de la présence de la bande D_2 et de son décalage vers les grandes longueurs d'onde par rapport à la bande M. D'après la théorie de FÖRSTER [14], la probabilité d'un transfert intermoléculaire dépend, entre autres facteurs, du degré de chevauchement de la bande d'émission du donneur et de la bande d'absorption de l'accepteur. Évaluant l'importance de ce facteur à l'aide de nos résultats, nous trouvons qu'il est de 30 à 40 % plus grand dans le cas d'un transfert monomère → dimère que dans le cas d'un transfert monomère → monomère. Cette différence pourrait entrer en ligne de compte pour expliquer l'efficacité des molécules de dimère dans le processus de terminaison des chaînes de transferts.

Dans la photosynthèse chlorophyllienne, on rencontre un phénomène qui nous semble pouvoir être également expliqué par un effet de dimérisation. On a remarqué que le rendement quantique de la photosynthèse diminuait brusquement jusqu'à zéro pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à environ 680 mμ, c'est-à-dire à droite de la bande « rouge » de la chlorophylle correspondant au premier niveau excité. EMERSON et coll. [15] ont récemment repris cette question et mis en évidence des effets d'une grande complexité. D'autre part, DUYSENS [16] a montré que le rendement de fluorescence de la chlorophylle *in vivo* présentait la même particularité. Des essais préliminaires sur le spectre d'absorption de la chlorophylle en solution dans l'huile de paraffine nous ont montré, comme dans le cas des autres colorants que nous avons étudiés, que la courbe de A_m présentait une légère dépression à gauche du maximum et une chute rapide à droite de celui-ci. Il est donc probable qu'ici encore nous ayons affaire à un phénomène de dimérisation. RODRIGO [17] par des mesures de poids moléculaire de la chlorophylle en solution aboutit à des conclusions semblables. Si cette suggestion était confirmée, elle pourrait être d'une très grande importance pour la compréhension de l'état physique et, partant, du rôle de la chlorophylle *in vivo*.

***

Ce travail a été accompli au Laboratoire de Photosynthèse de l'Université d'Illinois, Urbana, Ill. (U. S. A.) grâce à une bourse de la Fondation Rockefeller et avec le concours de U. S. Office of Naval Research. Je tiens à remercier les membres de ce laboratoire et, tout particulièrement, le Pr E. RABINOWITCH dont les conseils m'ont permis de mener à bien ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

(1) S. I. VAVILOV. — *Z. Physik*, (1927), **42**, 311.
(2) A. JABLONSKI. — *Nature*, 1933; 839, **131**, *Acta phys., URSS*, 1933, 2, 97.

(3) B. S. Neporent et N. A. Borisevich. — *Compt. rend.* (Doklady), *Acad., Sci. URSS.*, 1954, **94**, 447.
(4) Th. Företer. — *Fluoressenz Organischer Verbindungen*, Vandenhoeck et Ruprecht, Gottingen, 1951, p. 243.
(5) E. Rabinowitch et L. F. Epstein. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 69.
(6) E. E. Jacobs, A. E. Vatter et A. S. Holt. — *Arch, Biochem. Biophys.*, 1954, **53**, 228.
(7) Th. Förster et E. König. — *Z. Électrokem.*, 1957, **61**, 344.
(8) F. London. — *Z. physik. Chem.*, **B 11**, 1936, 222.
(9) G. Kortum. — *Z. physik. Chem.*, **B 33**, I et **B 34**, 255 1930.
(10) B. Walter. — *Ann. Physik*, 1889, 502, **36**, 518.
(11) S. I. Vavilov. — *Z. Physik.*, 1925, **31**, 750.
(12) F. Perrin. — *C. R. Acad. Sci.*, 1931, **192**, 1727.
(13) J. Ffanck et R. Livingston. — *Rev. Modern Phys.*, 1949, **21**, 505.
(14) Th. Föster. — *Cf. réf.* 4, p. 63.
(15) R. Emerson, R. Chalmers et C. Cederstrand. — *Proc. Natl. Acad., Sci.*, 1957, **43**, 133.
(16) L. N. M. Duysens. — « Transfers of Excitation Energy in Photosynthesis », *Thèse*, Utrecht, 1952, p. 45.
(17) F. A. Rodrigo. — « Experiments concerning the State of Chlorophyll in the Plant », *Thèse*, Utrecht, 1955, p. 57.

DISCUSSION

E. Rabinowitch. — Le déclin du rendement quantique de la fluorescence a été considéré par les physiciens russes (Stepanov) comme une loi fondamentale dite « loi de Vavilov » Neporent et Borisevich ont attribué ce déclin à l'existence d'une bande d'absorption purement vibratoire s'étendant vers l'infrarouge. Cependant Vavilov, dans son mémoire cité par Stepanov, affirme non pas le *déclin* du rendement quantique de la fluorescence au delà du maximum d'absorption, vers les grandes longueurs d'onde mais plutôt la *constance* de ce rendement dans tout le spectre d'absorption (tandis que le rendement énergétique augmente avec la longueur d'onde). Plus tard Vavilov a découvert le déclin de rendement quantique dans la région des grandes longueurs d'onde et suggéré une explication thermodynamique, qui fut cependant contestée par Pringsheim. L'explication de Neporent également n'est pas vraisemblable. Les résultats de Lavorel, démontrant que ce déclin dépend de la concentration, semblent prouver définitivement qu'il s'agit d'un effet d'agrégation, plutôt que d'une propriété intrinsèque de la molécule de colorant.

J'aimerais que M. Förster nous dise s'il connaît une explication de la non-fluorescence des molécules de dimère. Je peux ajouter ici que, selon les observations récentes de Brody dans notre laboratoire, la chlorophylle à basse température présente une bande intense de fluorescence vers 710 mμ (*in vivo*) et 720 mμ (*in vitro*, en forme concentration), qui pourrait être attribuée, à titre d'hypothèse de travail, à une forme associée du colorant (dimère?). Le dimère (?) serait donc probablement fluorescent, mais seulement aux basses températures,

A. Terenin. — La loi de Vavilov est, certes, la constance du rendement de la fluorescence dans un large domaine de longueurs d'onde. Elle est satisfaite seulement pour des molécules dissoutes. Pour les molécules complexes en phase gazeuse cette loi n'est plus valable, comme l'a montré B. Neporent chez nous. Le problème de la baisse rapide du rendement après une certaine limite vers les grandes longueurs d'onde n'a pas de relation directe avec cette loi de Vavilov. Il a été discuté dans les travaux des élèves de Vavilov et je puis citer comme exmple le livre de P. Stepanov (*Minsk, Acad. des Sciences*) où ce problème est discuté d'une manière provisoire.

Th. Förster. — L'incapacité à peu près générale des molécules de dimère à émettre de la fluorescence pourrait provenir, soit d'une diminution de la probabilité du processus d'émission radiative, soit d'une augmentation de la probabilité d'un processus non radiatif en compétition avec le précédent. On sait que la formation d'une molécule de dimère provoque un dédoublement de résonance des états singlet excité en deux états d'énergies différentes dont le plus bas doit être considéré comme un état émetteur en puissance. Pour des molécules douées d'une grande symétrie, la symétrie résultante du dimère devrait se traduire par une diminution de la valeur *f* de la probabilité de transition radiative entre cet état et l'état de base, ce qui a affectivement été constaté dans les spectres d'absorption de quelques dimères. On doit cependant se demander si cette particularité est suffisante pour expliquer à elle seule la non-fluorescence des dimères.

Une autre conséquence possible du dédoublement des états singlets excités est l'augmentation de la probabilité de désactivation non-radiative. Il existe au moins un état triplet entre l'état de base et l'état singlet le plus bas. Par suite de la moindre interaction de résonance entre les états triplets, ceux-ci sont beaucoup moins dédoublés dans le dimère. Il en résulte que l'intervalle d'énergie entre l'état singlet excité le plus bas du dimère et l'état de triplet se trouvant en dessous se trouve diminué, ce qui favorise une transition non radiative du premier au second.

Si cette explication était exacte, elle devrait conduire à un rendement de fluorescence plus élevé dans les solutions concentrées, ce qui a été mentionné d'une manière quatitative par Kautsky en 1939.

J. Lavorel. — Si l'on atteint le même état triplet par transition du singlet de la forme monomère ou de la forme dimère, mon explication du déclin de rendement de la photosynthèse à droite de la bande « rouge » de la chlorophylle doit être abandonnée, à moins d'admettre que la photsynthèse ne puisse utiliser que l'énergie correspondant à la transition de l'état singlet excité à l'état de base de la chlorophylle.

E. C. Wassink — Pour ma propre information, j'aimerais vous demander comment vous calculez à partir de vos résultats de la figure 1 la réabsorption de la fluorescence par le pigment.

J. Lavorel. — Aucune correction de ré-absorption de fluorescence n'était nécessaire, les mesures de fluorescence ayant été faites dans la partie non ré-absorbable de la bande de fluorescence.

P. Kallmann. — Je voudrais faire remarquer que l'équation

$$\left(\frac{\Phi}{A}\right)_c = \frac{\tau_c}{\tau_0}\left(\frac{\Phi}{A}\right)_0 \qquad (1)$$

n'est pas d'une application tout à fait générale. Dans le cas de l'extinction de concentration par réaction d'une molécule excité avec une molécule non excitée, la formule s'écrit :

$$\left(\frac{\Phi}{A}\right)_c = \frac{\text{[illegible]}}{\left(\frac{\tau_q}{\tau_e + \tau_q}\right)}\left(\frac{\Phi}{A}\right)_0 \qquad (2)$$

Cette formule ne considère pas le cas de dimères formés par des molécules non excitées. $Pq = 1/\tau_q$, $P_e = 1/\tau_e$ décrivent les probabilités d'inhibition et démission de fluorescence par unité de temps. La durée de la vie réelle est donnée par :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_e} + \frac{1}{\tau_q} \tag{3}$$

Si $\tau_e \gg \tau_q$:

$$\left(\frac{\Phi}{A}\right)_c \simeq \frac{\left(\frac{\tau_q}{\tau_e}\right)_c}{\left(\frac{\tau_q}{\tau_e}\right)_o} \times \left(\frac{\Phi}{A}\right)_o \tag{4}$$

Dans le cas de l'extinction de concentration, τ_q et τ_e peuvent dépendre de c. On peut facilement imaginer le cas où τ_e est essentiellement modifié lorsqu'une molécule excitée et une molécule non excitée entrent en collision et que τ_q est peu modifié. Dans ce cas on a la formule :

$$\left(\frac{\Phi}{A}\right)_c = \frac{(\tau_e)_o}{(\tau_e)_c} \times \left(\frac{\Phi}{A}\right)_o$$

et l'excitation de concentration n'est accompagnée par aucune modification de la durée de vie τ.

Nous sommes en train de rechercher expérimentalement si un tel cas se rencontre dans certaines solutions.

J. Lavorel. — J'aimerais exprimer mon désaccord avec le Professeur KALLMANN sur les points suivants :

1) Les formules (1) et (2) contiennent bien le cas de l'extinction de concentration par formation de dimère entre molécules non excitées; ceci par l'intermédiaire du facteur Ac qui doit être considéré comme une probabilité *a priori* d'excitation pouvant donner lieu à une émission de fluorescence. Autrement dit, Ac est le rapport de l'absorption lumineuse « active » (dans ce cas, pour les molécules de monomères) à l'absorption totale pour la concentration c.

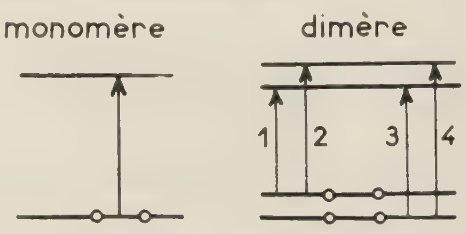
2) La signification classiquement attachée à la quantité $1/\tau_e$ interdit de la considérer comme une quantité variable, pour autant qu'il s'agit toujours de la même espèce fluorescente. Elle représente la probabilité d'émission par unité de temps *en absence* de tout autre processus de dissipation de l'excitation électronique, tandis que, en présence d'un ou de plusieurs de ces processus, cette probabilité est donnée par (3). D'ailleurs l'établissement de la formule (2) suppose explicitement que τ_e dans la formule (3) est indépendant de c.

3) Le cas de l'extinction par collision entre une molécule excitée et une molécule non excitée est précisément décrit dans la formule (3) sans qu'il soit nécessaire de faire varier τ_e. Dans ce cas, $1/\tau_q$, probabilité par unité de temps de l'*ensemble* des processus de dissipation non radiative, devra comprendre un terme correspondant à l'extinction par collision envisagée ci-dessus.

E. Rabinowitch. — Il me paraît certain que le déclin du rendement quantique de la photosynthèse dans la région des grandes longueurs d'onde, en dépit de sa ressemblance apparente avec le phénomène analogue observé dans la fluorescence, est foncièrement différent de ce dernier. BRODY a observé que chez les algues rouges, où le déclin de la photosynthèse commence vers 640 mμ, (tandis qu'il commence vers 680 mμ chez les algues vertes), le rendement quantique de la fluorescence reste constant jusqu'à 680 mμ. Les observations d'EMERSON et coll. suggèrent que le déclin de la photosynthèse commence dès que l'absorption devient exclusivement le fait de la chlorophylle *a*, sans contribution des pigments auxiliaires (chlorophylle *b*, phycocyanine, etc.). Le rendement quantique dans la région du déclin peut revenir à son niveau normal si l'on donne de la lumière absorbée par un de ces pigments auxiliaires. Ces résultats inattendus montrent que le rôle des pigments auxiliaires est plus complexe que le simple transfert d'une partie plus ou moins importante de leur énergie d'excitation à la chlorophylle *a*.

E. C. Wassink. — Si vous voulez suggérer que chez les diatomées le rendement de la photosynthèse tombe déjà à des longueurs d'onde supérieures à celle de la région d'absorption du fucoxanthol, je suis sûr que cela est inexact. Nous avons trouvé (1943) un rendement de photosynthèse identique ou même légèrement plus grand en lumière rouge.

S. Nikitine. — Je voudrais remarquer au sujet des spectres de dimères que l'on peut envisager le problème dans le cadre du modèle métallique. Une ébauche de calcul dans ce sens a été faite en 1953 (*). On montre que les niveaux quantiques des électrons métalliques du dimère sont comparables aux niveaux du monomère, à l'exception qu'ils sont doubles, conformément au schéma ci-contre.



Dans le monomère, la transition étant unique, dans le dimère on devrait observer quatre transitions, mais les transitions 2 et 3 du diagramme sont pratiquement identiques avec celle du monomère. Les intensités d'oscillateurs pour ces transitions n'ont pas été calculées. Mais on peut prévoir que pour des raisons de symétrie des fonctions d'onde les transitions 2 et 3 seront probablement beaucoup moins intenses que 1. 4 pourrait être plus intense que 2 + 3. Ceci correspondrait aux observations de M. LAVOREL. Il serait certainement facile de préciser ce point à partir des travaux cités en effectuant le calcul des moments de transition. Ce calcul bien que laborieux est élémentaire.

(*) S. NIKITINE, *J. de Chim. Phys.*, 1953, **50**, 407; voir aussi pour le calcul des intensités d'oscillateurs : S. NIKITINE, *J. de Chim. Phys.*, 1950, **47**, 613.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE SUBSTANCES FLUORESCENTES. SUR L'EFFICACITÉ DES INHIBITEURS DE FLUORESCENCE

par Jean LAVOREL,

Chargé de Recherche au C. N. R. A.

[*Station Centrale de Physiologie Végétale, Versailles.*]

SOMMAIRE

Lorsqu'on augmente la concentration de substances fluorescentes en solution, on constate un effet général d'exaltation de l'efficacité des inhibiteurs de fluorescence. Cet effet, analogue au phénomène d'auto-inhibition de fluorescence, est attribué à la migration de l'excitation électronique par transferts de résonance.

Introduction.

On a depuis longtemps soupçonné l'intervention, dans le phénomène d'auto-inhibition de fluorescence, de molécules spéciales jouant un rôle de piège pour l'excitation électronique. Pour un certain nombre de substances fluorescentes en solution, il est établi que ces molécules spéciales sont des dimères non fluorescents (1). Elles contribuent de différentes façons à l'inhibition de la fluorescence (2,3,4). En premier lieu, leur présence dans la solution *diminue* l'absorption « active » du rayonnement d'excitation (mécanisme I ou statique par association). En second lieu, elles peuvent se former à l'occasion d'une *rencontre* entre une molécule excitée et une molécule non excitée, avec dissipation non radiative de l'excitation électronique (mécanisme II ou dynamique par réaction bimoléculaire). En troisième lieu enfin, l'excitation électronique peut être convoyée, par le jeu des *transferts par résonance*, jusqu'à ces molécules-pièges (mécanisme III ou dynamique par transferts de résonance). Diverses propriétés des solutions fluorescentes (spectre d'absorption, spectre d'action de fluorescence, durée de vie et polarisation de fluorescence, forme de la courbe d'auto-inhibition) permettent en principe d'évaluer l'importance relative de ces différents mécanismes.

Il faut bien remarquer que le mécanisme III n'a d'efficacité qu'en présence des mécanismes I et II, qui à cet égard sont plus fondamentaux. La migration d'excitation électronique par transfert est incapable en elle-même d'accélérer la dissipation non radiative de l'excitation électronique (*) : elle ne fait qu'amplifier les effets des mécanismes I et II. D'un autre côté, on doit s'attendre à ce que ce mécanisme exalte également toute inhibition d'origine externe, qu'elle soit de type I ou II.

A partir d'observations allant dans ce sens, nous avons été conduit à étudier l'action d'inhibiteurs dynamiques sur la fluorescéine en solution aqueuse NaOH I M et celle d'inhibiteurs statiques sur la rhodamine B en solution dans l'alcool absolu. [Cf. Weber (6), pour un critère permettant de déterminer le caractère « statique » ou « dynamique » d'un inhibiteur.]

Méthode et Résultats.

1. *Méthode expérimentale.* — La fluorescence de solutions contenues dans une cuvette de spectrophotomètre était excitée par la lumière d'une lampe à vapeur de Hg (SP 500) et observée à environ 150° de la direction du faisceau incident à l'aide d'un photomultiplicateur (Dumont 6292). Des filtres interférentiels complémentaires permettaient de séparer le rayonnement excitateur de la fluorescence. Voici les longueurs d'onde des bandes passantes des filtres utilisés :

	Fluorescéine	Rhodamine B
	—	—
Excitation	480 mμ	544 mμ
Observation	520 mμ	620 mμ

L'intensité lumineuse fournie par la lampe n'étant

(*) Une théorie due à Vavilov (5) suppose explicitement qu'à chaque transfert correspond une certaine probabilité de dissipation, mais cette notion ne repose sur aucune preuve théorique. La considération de la nature de l'accepteur (molécule normale ou molécule-piège) permet de réintroduire une probabilité de dissipation non radiative attachée à chaque acte de transfert, et dont la signification physique est évidente

pas très constante, une faible partie du faisceau excitateur, prélevée à l'aide d'une plaque de plexiglass à 45° de l'axe du faisceau, tombait sur une cellule à couche d'arrêt qui permettaient de rapporter la réponse du photomultiplicateur à une même valeur de l'intensité du faisceau excitateur. Pour tenir compte d'une petite quantité de lumière excitatrice réfléchie vers le photomultiplicateur, toutes les lectures étaient corrigées au moyen d'un témoin constitué par une solution d'encre noire. Les mesures étaient faites à la température ambiante, soit aux alentours de 18 °C.

2. *Fluorescéine en solution aqueuse* NaOH I M. — Nous avons étudié sur ce système l'effet de plusieurs inhibiteurs minéraux bien connus. La constante d'inhibition K est définie par la relation classique :

$$\varphi(q) = \frac{1}{1 + \mathrm{K}q}$$

où $\varphi(q)$ = rendement relatif de fluorescence à la concentration q de l'inhibiteur et à concentration c constante de la substance fluorescente. Cette formule, dite de Stern-Volmer, n'est bien vérifiée que pour des valeurs de q tendant vers zéro; elle exprime le fait que l'inhibition résulte d'une réaction bimoléculaire entre l'inhibiteur et la substance fluorescente excitée.

Pour mettre en évidence l'effet recherché, il est nécessaire de mesurer K pour différentes valeurs de c (d'après la théorie de Förster[7], la fréquence des transferts par résonance varie comme l'inverse de la puissance 6e de la distance intermoléculaire). Il est alors nécessaire de modifier la formule précédente pour tenir compte du phénomène d'auto-inhibition que l'on rencontre aux concentrations les plus élevées de la substance fluorescente. Si l'on représente par :

$$\varphi(c) = \frac{1}{1 + \mathrm{Q}(c)}$$

le rendement relatif en fonction de c (et en absence d'inhibiteur), où $\mathrm{Q}(c)$ est une fonction croissante de c déterminée expérimentalement, on peut voir que :

$$\varphi(q, c) = \frac{1 + \mathrm{Q}(c)}{1 + \mathrm{Q}(c) + \mathrm{K}(c)q} = \frac{1}{1 + \dfrac{\mathrm{K}(c)}{1 + \mathrm{Q}(c)}\,q} = \frac{1}{1 + \mathrm{K}'(c)q}$$

où l'on a écrit $\mathrm{K}(c)$ au lieu de K pour indiquer que K peut être fonction de c et où $\mathrm{K}'(c)$ correspond à la constante d'inhibition observée expérimentalement; cette formule exprime le fait qu'il y a compétition entre l'auto-inhibition et l'inhibition d'origine externe.

D'où un moyen direct de voir si l'effet observé se ramène à une simple compétition ou si K est réellement fonction de c. On comparera les courbes $\dfrac{\mathrm{K}'(c)}{\mathrm{K}(o)}$ et $\varphi(c)$ tracées en fonction de c :

a) s'il y a simplement compétition, $\mathrm{K}(c)$ = constante, et les courbes précédentes seront confondues;

b) s'il y a en plus un effet spécifique, ces courbes ne seront plus confondues : en particulier, s'il y a exaltation de l'inhibition par le mécanisme III, la première se situera au-dessus de la seconde.

Les résultats obtenus dans le cas de plusieurs inhibiteurs de la fluorescéine sont représentés sur la figure 1, où la comparaison précédente montre immédiatement qu'il y a exaltation de l'inhibition

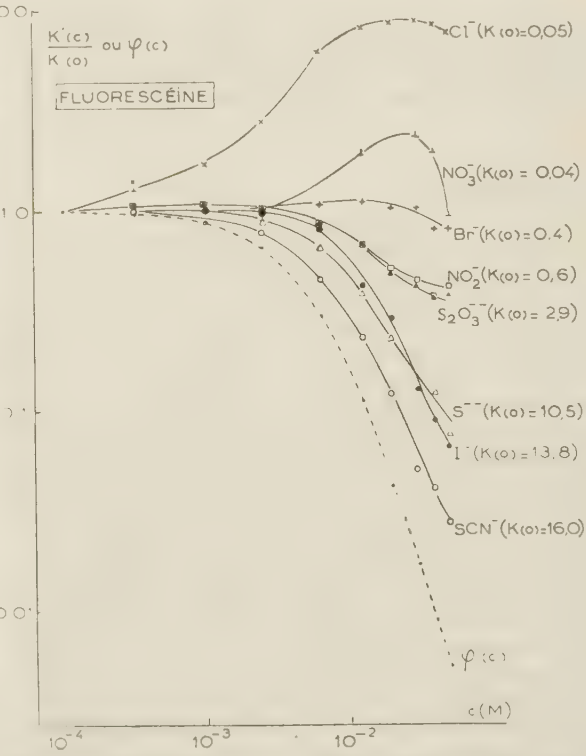


Fig. 1. — Comparaison de $\mathrm{K}'(c)/\mathrm{K}(0)$ [courbes en trait plein] et de $\varphi(c)$ [courbe en tirets] pour différents inhibiteurs de fluorescence de la fluorescéine. La formule de chaque inhibiteur et sa valeur de K(0) figure en regard de la courbe qui lui correspond. Les échelles des deux axes sont logarithmiques.

dans tous les cas considérés et que ce phénomène se produit précisément dans la zone de concentrations de l'auto-inhibition. Cette figure appelle encore

deux remarques importantes sur lesquelles nous reviendrons plus longuement :

1. Dans l'ensemble, les courbes se placent de haut en bas dans l'ordre des K(*o*) croissants, c'est-à-dire que l'exaltation de l'inhibition est d'autant moins intense que l'efficacité de l'inhibiteur est plus grande pour *c* tendant vers zéro.

2. Les inhibiteurs les plus faibles, tels que Cl^- et NO_3^-, semblent former un groupe à part, en particulier Cl^- dont l'effet inhibiteur augmente déjà pour des valeurs de *c* inférieures à la zone d'auto-inhibition.

2. *Rhodamine B en solution dans l'alcool absolu.* — Nous avons fait une étude analogue dans le cas de l'inhibition de la fluorescence de la rhodamine B par différentes substances organiques. L'action de ces inhibiteurs, par exemple l'hydroquinone, est caractérisée par le fait qu'elle ne s'accompagne d'aucune augmentation importante de la polarisation de fluorescence [6] et qu'elle n'est qu'assez peu modifiée

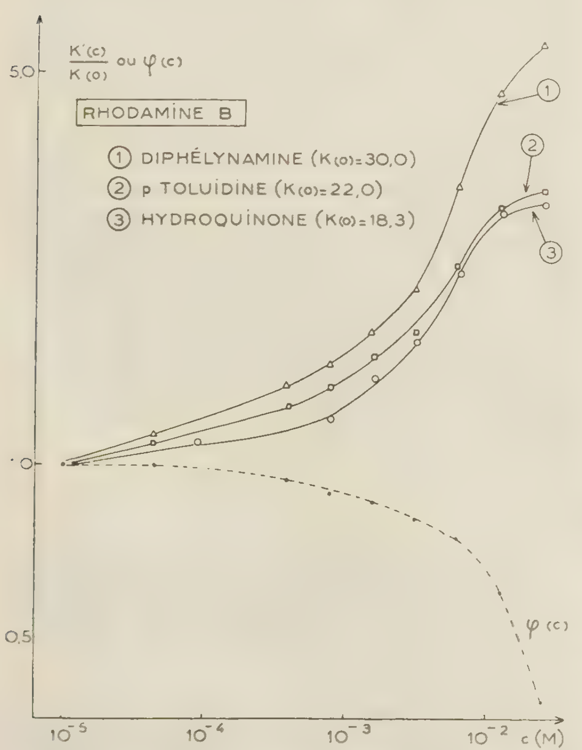


Fig. 2. — Variation de K′(*c*)/K(0) [courbes en trait plein] et de φ(*c*) [courbes en tirets] en fonction de la concentration *c* de la rhodamine B. Les échelles des deux axes sont logarithmiques.

par des changements de viscosité du milieu. A l'inverse des inhibiteurs de la fluorescéine considérée précédemment, nous avons donc ici affaire à une inhibition de type plus statique que dynamique. Cette situation est analogue à celle de l'auto-inhibition et l'on doit s'attendre à trouver une exaltation de l'inhibition par le mécanisme III lorsque *c* augmente.

La figure 2 montre qu'il en est bien ainsi. Dans cette figure, nous avons conservé la représentation en K′(*c*)/K(*o*) qui permet de se rendre compte facilement de l'effet d'exaltation de l'inhibition, mais la comparaison de cette quantité avec φ(*c*) ne peut évidemment pas avoir la même signification que dans le cas d'une inhibition purement dynamique. On remarquera une saturation de l'effet pour les valeurs les plus élevées de *c*.

Discussion.

En ce qui concerne le cas de la rhodamine B, où l'inhibition est de type mixte, donc relativement complexe, on remarquera simplement (*) que la saturation de l'effet d'exaltation peut s'interpréter, dans notre hypothèse, par le fait que la migration des quanta d'excitation électronique doit distribuer ceux-ci entre une proportion constante (pour une même valeur de *q*) de complexes rhodamine B — inhibiteur et une proportion croissante avec *c* de dimères de la rhodamine B; autrement dit, il y aurait compétition, à l'intérieur du mécanisme III, entre les molécules-pièges des deux sortes. La faible valeur de la constante d'association de la rhodamine B dans l'alcool (constante diélectrique peu élevée) explique que cette compétition ne se manifeste que pour les valeurs les plus grandes de *c*. Enfin, d'après la théorie de Förster [7], la probabilité d'un transfert intermoléculaire dépend du degré de chevauchement de la bande d'émission du donneur et de la bande d'absorption de l'accepteur : si l'association colorant-inhibiteur s'accompagne d'une modification spectrale, il y aura lieu d'en tenir compte pour expliquer des effets d'exaltation de l'inhibition par le mécanisme III variables d'un inhibiteur à l'autre. Tel pourrait être le cas pour la diphénylamine par rapport aux deux autres inhibiteurs étudiés.

Nous reviendrons maintenant sur les deux remarques faites au sujet des inhibiteurs de la fluorescéine.

1. *Première remarque.* — Pour rendre compte de la relation observée entre l'ordre des courbes K′(*c*)/K(*o*) et les valeurs de K(*o*), il est nécessaire

(*) L'augmentation, faible mais certaine, de K′(*c*)/K(*o*) pour *c* inférieur à la zone d'auto-inhibition est difficile à interpréter : peut-être est-elle l'indice d'une inhibition dynamique par rencontre de molécules excitées et de molécules de complexe, superposée à l'inhibition statique.

de faire intervenir le rapport de la durée de visite de l'excitation électronique au temps nécessaire pour la formation d'un complexe activé (*) entre la molécule d'inhibiteur et la molécule fluorescente excitée. Au sujet d'un problème analogue qui se pose en photosynthèse, RABINOWITCH ([9]) avait fait remarquer que, si la première durée est courte devant la seconde, la visite de plusieurs molécules augmente les chances d'une dissipation de l'excitation électronique par un couple temporaire inhibiteur-substance fluorescente; au contraire, si la première durée est longue devant la seconde, les chances de cet événement ne sont pas sensiblement modifiées par des visites répétées. Or, s'il est vrai que les réactions d'inhibition de fluorescence qui nous occupent sont plutôt du type « contrôlé par la diffusion » (comme en témoigne leur grande dépendance à l'égard de la viscosité), le fait que $K(o)$ varie d'un inhibiteur à l'autre indique que les énergies d'activation pour la formation du complexe activé sont seulement du même ordre de grandeur, et peut-être même plus grandes que l'énergie d'activation du processus de diffusion. Suivant cette manière de voir, il est donc normal de constater que lorsque la durée de préparation du complexe activé est plus longue — ce qui correspond à une énergie d'activation plus élevée, donc à une valeur plus faible de $K(o)$ — l'effet d'exaltation de l'inhibition par le mécanisme III est plus important — ce qui correspond à un plus grand écart entre la courbe $K'(c)/K(o)$ et la courbe $\varphi(c)$.

2. *Seconde remarque.* — Pour observer l'effet d'inhibiteurs faibles comme Cl^- et NO_3^-, il est nécessaire d'introduire dans la solution des quantités assez importantes de ces substances. Alors que pour les autres inhibiteurs, la force ionique du milieu, principalement déterminée par NaOH I M, peut être considérée comme constante, il n'en va plus de même pour ces inhibiteurs faibles. L'effet d'exaltation considérable de l'inhibition pour ces corps doit être la résultante d'un effet direct et d'un effet indirect. L'effet direct — par le mécanisme III — doit être déjà en lui-même important, en accord avec les conclusions du paragraphe précédent. Quant à l'effet indirect, il consiste en une augmentation de l'auto-inhibition du type I et II sous l'influence de la force ionique additionnelle des inhibiteurs faibles [cf. BOUCHARD ([10])].

Pour les valeurs les plus élevées de c, l'augmentation relative de force ionique due à l'inhibiteur deviendra moins importante et l'effet indirect va se saturer. La saturation de l'effet direct dans les mêmes conditions résulte simplement d'une compétition croissante avec l'auto-inhibition. Une saturation, puis une décroissance de l'effet résultant d'exaltation de l'inhibition se voit très bien sur les courbes

$$K'(c)/K(o)$$

pour Cl^- et NO^-_3 (fig. 1).

En conclusion, nous pensons que l'effet d'exaltation de l'efficacité des inhibiteurs de fluorescence par augmentation de la concentration des substances fluorescentes, dans les cas où ces substances présentent le phénomène d'auto-inhibition de fluorescence en partie au moins par le mécanisme III, résulte de l'opération de ce même mécanisme dans l'inhibition d'origine externe. Cette conclusion est assez naturelle si l'on admet que, quelle que soit la cause ultime de l'inhibition dynamique, elle représente toujours un processus élémentaire de dissipation en compétition avec les autres processus de dissipation (fluorescence, conversion interne, etc.) qui limitent la durée de vie des molécules excitées (*). Une analyse plus poussée devrait montrer que le passage de l'excitation électronique dans plusieurs molécules par transferts de résonance ne doit évidemment pas modifier la vitesse globale de processus tels, par exemple, que l'émission de fluorescence, dont la probabilité est la même pour toutes les molécules; par contre, ces transferts répétés doivent accélérer la vitesse globale de tout processus dont la probabilité, pendant la durée d'une visite, est variable d'une molécule à l'autre : c'est le cas de l'inhibition dynamique par réaction bimoléculaire (mécanisme II) dans la mesure où la durée de préparation du complexe activé n'est pas extrêmement courte devant la durée de la visite; c'est encore davantage le cas pour l'inhibition statique par dimérisation ou par association stable de l'inhibiteur avec la substance fluorescente.

* * *

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biologie Physico-chimique de la Faculté des Sciences, Paris. Je remercie M. le Pr WURMSER pour son accueil et pour l'intérêt qu'il a porté à la poursuite de ce travail.

(*) STOUGHTON et ROLLEFSON ([8]) ont montré, par l'étude de l'effet de la force ionique, que l'inhibition ne résultait pas d'une simple collision de seconde espèce mais d'une véritable réaction bimoléculaire avec formation d'un complexe activé.

(*) Comme une réaction d'inhibition de fluorescence peut être considérée comme une réaction photochimique plus ou moins masquée, il est naturel de se demander si la théorie des transferts d'excitation électronique par résonance n'aurait pas pour certaines réactions photochimique des conséquences semblables à celles que nous croyons voir à l'œuvre dans les phénomènes que nous avons observés. A la vérité, une telle possibilité a déjà été envisagée en physicochimie de la photosynthèse comme solution vraisemblable du problème de l'« unité photosynthétique » ([11, 12]).

BIBLIOGRAPHIE

(1) J. Lavorel. — *Communication à ce Colloque et J. Phys. Chem.*, 1957, **16**, 1600.
(2) Th. Förster. — *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*, Vandenhoeck et Ruprecht, *Gottingen*, p. 243.
(3) E. Rabinowitch et L. F. Epstein. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 69.
(4) F. Perrin. — *C.R.*, 1931, **192**, 1727.
(5) S. I. Vavilov. — *C.R., Acad. Sci. USSR.*, 1944, **45**, 7.
(6) G. Weber. — *Trans. Faraday, Soc.*, 1948, **44**, 185.
(7) Th. Förster. — *Loc. cit.*, p. 83.
(8) R. W. Stoughton et G. K. Rollefson. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 2632.
(9) E. Rabinowitch. — *Photosynthesis and Related Processes, Interscience Pub.*, p. 760.
(10) J. Bouchard. — *J. Chim. Phys.*, 1936, **33**, 325.
(11) R. Emerson et W. Arnold. — *J. Gen. Physiol.*, 1932, **15**, 391 et 1932, **16**, 191.
(12) H. Gaffron et K. Wohl. — *Naturwiss.*, 1936, **24**, 81, 103.

DISCUSSION

G. Weber. — Les observations de M. Lavorel sur l'augmentation de l'inhibition de la fluorescence quand la concentration de la substance fluorescente croît, qui est sans doute due au transfert d'excitation parmi les molécules fluorescentes, nous fournissent la possibilité d'estimer la distance de transferts entre molécules semblables. Pour cela, nous n'avons jusqu'à présent que les mesures de dépolarisation. Je veux demander à M. Lavorel s'il a fait des calculs du nombre des transferts dans ces solutions.

J. Lavorel. — Il est en effet possible de déduire des variations de K' (e) une mesure du nombre de molécules visitées par l'excitation électronique. Le cas le plus simple à traiter est celui de l'inhibition de fluorescence par association du colorant avec l'inhibiteur, mais le calcul exige la connaissance de la variation du coefficient d'absorption résultant de l'association.

SUR LE TRANSFERT D'ENERGIE DANS LES SYSTEMES BIOLOGIQUES

par Albert SZENT-GYORGYI,

[*The Institute of Muscle Research at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts.*]

Traduit par J. Lavorel

SOMMAIRE

Des expériences sur le muscle suggèrent un transfert d'énergie à des distances supérieures aux distances atomiques. On discute les possibilités d'un transfert d'énergie par bandes d'énergie et par résonance. On montre que les excitations triplet sont vraisemblablement celles dans lesquelles l'énergie est transmise. Ces excitations pourraient recevoir un supplément de stabilité de l'isolement énergétique produit par l'eau ordonnée en réseau.

Nos études sur le muscle ont montré que l'énergie de liaison chimique, qui est transformée en travail mécanique dans le muscle, est libérée dans une région limitée de la fibre musculaire. Puisque c'est la masse entière de la fibre qui, par l'intermédiaire de son actomyosine, participe à la contraction, il doit vraisemblablement se produire un transfert d'énergie. La physique offre deux mécanismes pour un tel transfert d'énergie. Le premier est le transfert d'énergie dans les bandes d'énergie; il est responsable de la conductibilité électrique des conducteurs et des semi-conducteurs. Il y a de cela une quinzaine d'années, j'ai suggéré que les protéines pourraient être des semi-conducteurs. Il semble maintenant probable que des organites spécifiques, tels que les chloroplastes ou leurs grana, se conduisent effectivement comme des semi-conducteurs (1), et il est possible que cette conductibilité intervienne réellement dans la photosynthèse. La mécanique quantique est également en faveur de la possibilité d'une nature semi-conductrice des protéines (2). Malgré ces résultats positifs, la théorie des protéines comme semi-conducteurs ne s'est pas montré féconde et, jusqu'à présent, ne nous a pas donné les moyens d'une meilleure compréhension du problème général de la transmission de l'énergie dans les systèmes biologiques.

L'autre voie possible de transmission d'énergie est la transmission par résonance. La participation de ce moyen de transmission est hors de doute dans les cas de photosynthèse. Pourtant, aucune tentative n'a encore été faite pour étendre cette théorie à d'autres phénomènes biologiques. Au cours de ces dernières années, j'ai consacré mon travail au problème de savoir si le transfert d'énergie par résonance ne serait pas un des modes principaux de transmission de l'énergie dans les tissus vivants, en particulier dans les cas où l'énergie oxydative doit être transformée en énergie de liaison et où l'énergie de liaison doit être transformée en travail, qu'il soit mécanique, osmotique ou électrique.

Le transfert d'énergie par résonance implique l'idée d'une excitation électronique, et jusqu'à présent la biologie a considéré l'énergie de liaison comme la forme principale sous laquelle les systèmes vivants manipulent l'énergie. J'ai rencontré une grande résistance parmi les biologistes à considérer l'excitation électronique comme une autre possibilité. Il m'est impossible de partager ce sentiment, car je n'aperçois aucune différence essentielle entre oxydo-réduction et excitation électronique. Lorsqu'un électron est excité, il est porté à un niveau d'énergie plus élevé et se trouve plus éloigné du noyau. Plus il lui est communiqué d'énergie, plus l'orbite qu'il va occuper se trouve éloignée. S'il acquiert suffisamment d'énergie, il peut être tout à fait arraché de la molécule et s'en aller à l'infini. La perte d'un électron par une molécule est équivalente à son oxydation. Ainsi, une excitation qui éloigne seulement l'électron du noyau dans une position intermédiaire peut être considérée comme une oxydation partielle. L'opposé est vrai pour la réduction.

Cependant, on peut élever de sérieuses objections contre l'idée d'une participation de l'excitation électronique dans les réserves énergétiques régulières de la cellule vivante. La première est la brièveté de la durée de vie de l'excitation, qui est habituellement de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} secondes. La vie étant un processus lent, ce temps est trop court pour permettre aux systèmes vivants de faire quoi que ce soit avec cette énergie. Il existe un moyen de prolonger cette

durée de vie, c'est de retourner le spin de l'électron excité et d'amener la molécule dans l'état triplet. Dans les verres, spécialement à basses températures comme celle de l'azote liquide, on peut constater directement l'existence de cet état triplet par l'observation d'une émission de lumière à partir de l'état triplet et par une post-luminescence prolongée. On a beaucoup parlé de cet état triplet à propos de la chlorophylle, mais, à part ce cas spécial, on n'a jamais considéré cette possibilité, peut-être parce qu'on a généralement regardé l'état triplet comme un phénomène rare, visible seulement dans des conditions très spécifiques, le couplage spin-orbite étant en règle générale très faible.

Cependant, un examen rapide montre l'erreur de ces suppositions. Les règles de sélection nous enseignent que la transition de l'état triplet à l'état de base est une transition interdite. Mais la règle n'est pas trop rigide et il y a toujours quelque fuite. Pour rendre observable cette fuite plutôt faible, il faut augmenter considérablement le nombre des électrons dans l'état triplet et l'on peut le faire en les protégeant contre l'agitation thermique, c'est-à-dire, contre les collisions à l'occasion desquelles ils peuvent dissiper leur énergie. Cette protection est assurée par les basses températures dans les verres rigides; elle nous permet de saturer les niveaux triplet et d'augmenter ainsi le nombre des électrons dans l'état triplet et les chances d'émission de photons à partir de cet état. Une post-luminescence provenant de l'état triplet est, dans ces conditions, un phénomène courant. Mais si la même substance, qui présente une post-luminescence prolongée dans un milieu vitreux à basse température, ne présente aucune émission lumineuse semblable à température ambiante dans l'état liquide, ce n'est pas parce que la transition à l'état triplet ne se produit pas, mais parce que l'énergie de cet état se dissipe dans une collision sans émission de photon, ce qui ne signifie pas qu'il n'y a pas de transition à l'état triplet. Selon toute probabilité, l'électron passe tout aussi facilement dans l'état triplet, mais cet état n'est pas assez stable pour se manifester sous forme d'émission lumineuse. Si un électron excité n'émet pas son énergie sous forme de fluorescence, ce peut être soit parce que l'énergie a été dissipée dans une conversion interne, soit parce que elle a été dissipée dans une collision de seconde espèce, soit enfin parce que l'électron est passé dans l'état triplet. Il semble probable que dans beaucoup de molécules possédant un systèmes important de doubles liaisons conjuguées la plus grande partie des électrons excités vont dans l'état triplet, cette transition étant responsable du rendement de fluorescence peu élevé. L'énergie de l'état triplet est alors dissipée dans une collision de seconde espèce.

Bien que les durées de vie des triplets soient, en règle générale, un millier de fois plus longues que celles des singlets, on pourrait se demander si en milieu liquide à la température de l'organisme leur stabilité est assez importante pour permettre une utilisation biologique de leur énergie. Bien que chaque collision ne soit pas nécessairement efficace, la fréquence des collisions est tellement grande, de l'ordre de 10^{11} sec^{-1}, que des doutes à cet égard sembleraient justifiés. Cependant, beaucoup de molécules présentent une post-luminescence prolongée en-dessous de — 40 °C lorsqu'elles sont congelées dans de l'eau en présence de petites quantités de glucose et le cours de cette luminescence est monomoléculaire, ce qui indique que la lumière provenait d'un triplet et non pas de la formation d'un cristal phosphore ([3, 4]). Si à — 40 °C les triplets sont assez stables pour produire une post-luminescence à longue vie, alors ils doivent être assez stables à la température de l'organisme, soixante-dix degrés plus élevée, et durer assez longtemps pour rendre possible leur utilisation dans les systèmes vivants.

Cette dernière conclusion pourrait être rejetée pour la raison que, quelle que soit la température, l'eau, en se congelant, forme des réseaux rigides assurant une protection aux molécules excitées qui n'existe pas dans l'eau non congelée des systèmes vivants. Ceci soulève une question de la plus grande importance biologique : l'état physique de l'eau dans les systèmes vivants. Il paraît de plus en plus certain que l'eau forme autour des surfaces un réseau étendu de telle sorte qu'il semble vraisemblable que dans les structures biologiques très condensées l'eau est présente sous forme d'eau ordonnée en réseau et non pas d'eau désorientée. Suivant la nature de la surface ou de ses groupes actifs, l'eau peut former différents réseaux, comme par exemple un réseau hexagonal ou cubique très ouvert. Ceci nous conduit dans un domaine extrêmement fascinant. Je ne veux pas entrer ici dans le détail de ce problème, mais simplement dire qu'il est très possible que dans les systèmes biologiques nous trouvions une rigidité dans la phase aqueuse conduisant à un isolement des molécules excitées du point de vue de l'énergie; à son tour, l'isolement énergétique des molécules pourrait prolonger suffisamment la durée de vie de l'état triplet pour le rendre disponible comme source d'énergie pour les systèmes biologiques.

Une troisième et également sérieuse objection pourrait être élevée contre l'hypothèse du rôle biologique des états excités du point de vue quantitatif. Les premiers niveaux excités dans la plupart des substances à système de doubles liaisons conjuguées se situent dans l'ultra-violet et exigent des énergies de l'ordre de 10^5 cal qui ne sont pas disponibles dans les systèmes vivants. Dans les colorants, les énergies se situent dans la région visible, exigeant

4 à 8 × 10^4 calories. Les quanta d'énergie biologique, comme ceux des liaisons riches, sont de l'ordre de 10^4, donc encore trop faibles, et ainsi on pourrait objecter que les énergies disponibles pour l'excitation électronique sont trop petites pour être considérées. A ceci, cependant, on peut répondre par trois arguments. *Primo*, nous avons que dans la bioluminescence des photons de 60 000 cal sont réellement émis et qu'il y a donc des systèmes vivants capables de produire ces excitations. Il est possible que la bioluminescence soit seulement un cas d'espèce et qu'une excitation analogue se produise dans de nombreux processus biologiques, la bioluminescence n'étant un cas d'espèce seulement parce que l'énergie (qui, dans les autres processus, est utilisée) est émise sous forme de photons. *Secundo*, l'excitation de l'état triplet pourrait avoir de faibles valeurs énergétiques, par exemple 10 000 cal, et il paraît possible que des électrons soient excités à des niveaux triplet aussi bas par des processus chimiques, même si les mêmes électrons ne peuvent pas être excités par la lumière pour une raison ou une autre, comme des considérations de symétrie. *Tertio*, les molécules biologiques peuvent former des complexes comme, par exemple, la riboflavine qui forme un complexe avec la protéine qui l'active. De ce fait, la riboflavine perd sa fluorescence, ce qui, en fait, pourrait être dû à ce que les molécules excitées vont dans l'état triplet. Une molécule une fois engagée dans un complexe pourrait voir sa probabilité effectuer une transition dans l'état triplet très augmentée (les dimères ont tendance à former des triplets) et le niveau énergétique de cette excitation pourrait être assez bas. L'excitation triplet pourrait être alors transmise telle quelle, comme triplet, à d'autres molécules par résonance ([5]). Dans une molécule de protéine, comme l'ont montré Karreman, Steele et moi-même, les groupements aromatiques sont assez proches pour permettre une telle transmission ([6]).

Résumant la situation actuelle, nous pouvons donc dire qu'il n'existe aucune indication montrant que les transferts de résonance de l'énergie d'excitation joue en effet un rôle plus large en biologie, mais il n'y a pas de raison non plus de refuser une importance générale à un tel moyen de transmission de l'énergie. Le problème reste largement ouvert et pourrait nous donner la réponse de certains grands problèmes de la biologie.

BIBLIOGRAPHIE

(1) W. Arnold et H. K. Sherwood. — *Proc. natl. Acad. Sc.*, 1957, **43**, 104.

(2) M. G. Evan et J. Gergely. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1949, **30**, 188.

(3) A. Szent-Györgyi. — « Bioenergetics », *Acad. Press.*, N.-Y., 1957.

(4) R. H. Steele et A. Szent-Györgyi. — *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1957, **43**, 477.

(5) A. Terenin et V. Ermolaev. — *Trans. Faraday Soc.*, 1950, **52**, 1042.

(6) G. Karreman, R. H. Steele et A. Szent-Györgyi. — *Proc. Natl. Acad. Sc.*, sous presse.

DISCUSSION

M. Magat. — Dans votre théorie vous avez admis l'existence dans les protéines d'une semi-conductivité électronique. Or, nous savons maintenant par les travaux de Eigen que dans la glace (et pourquoi pas dans les couches d'eau adsorbées?) il existe une semi-conductivité protonique. Je pense que l'énergie d'activation sera plus faible que pour la semi-conductivité électronique. La vitesse de propagation est plus faible mais suffisante.

A. Szent-Györgyi. — Il est très possible qu'intervienne une conduction par le réseau de l'eau. Récemment, à l'occasion d'une conférence à l'Institut Rockefeller à New-York, le docteur Shedlovsky a fait remarquer qu'il était d'accord avec moi à condition que je veuille remplacer les électrons par des protons.

G. Oster. — Y-a-t-il des raisons impérieuses de supposer que pour la contraction musculaire, ou pour tout processus biologique ne faisant pas intervenir la lumière, des états excités électroniquement sont impliqués?

A. Szent-Gyorgyi. — Pour en donner un exemple, il est impossible de placer trois molécules de cytochrome de façon que les atomes de Fe se touchent, bien que nous sachions que les électrons sont transmis de l'un à l'autre.

CONVERSION DE L'ÉNERGIE DANS LES PROCESSUS DE PHOTOSYNTHÈSE (*)

par Gordon TOLLIN, Power B. SOGO et Melvin CALVIN

[*Radiation Laboratory and Department of Chemistry University, of California, Berkeley, 4, Californie.*]

Traduit par Mme J. Cyrot.

SOMMAIRE

Les concepts de la photophysique de l'état solide sont appliqués à des substances biologiques, spécialement à la matière particulaire dérivée des plantes vertes. Des signaux de résonance de spin électronique photoinduits ont été observés dans des chloroplastes isolés et dans d'autres substances de plantes vertes; leur temps de croissance n'est pas modifié si l'on réduit la température à — 140 °C. On a également étudié la luminescence de ces corps dans de multiples conditions. Les résultats de ces études se sont révélés compatibles avec un mécanisme impliquant la recombinaison des électrons et des trous piégés dans un réseau quasi-cristallin. On a proposé certains détails d'un tel mécanisme qui donnent une idée de la façon dont l'énergie lumineuse intervient au cours de la photosynthèse.

On a pu représenter à peu près complètement le chemin réactionnel par lequel le carbone passe de sa forme à basse énergie, le gaz carbonique, à sa forme à haute énergie, principalement les hydrates de carbone, grâce à l'utilisation de carbone traceur : la figure 1 résume l'état actuel de nos connaissances.

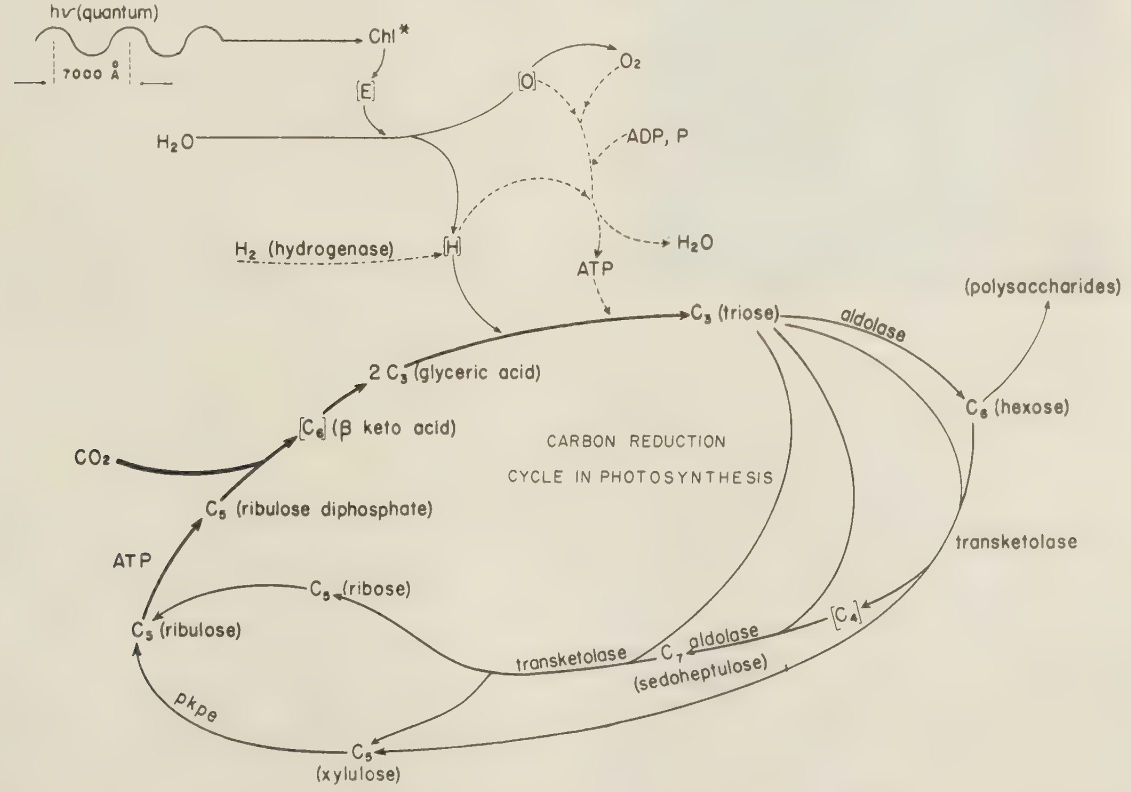


Fig. 1. — Cycle proposé pour la réduction du carbone dans la photosynthèse.

(*) Le présent travail a été effectué sous le parrainage de la U.S. Atomic Energy Commission.

L'appareil photochimique qui fournit la force nécessaire pour que le carbone passe de l'anhydride carbonique au polysaccharide, désigné par [E] sur la figure 1, est contenu dans les chloroplastes des plantes vertes et dans les chromatophores d'organismes simples tels que les bactéries photosynthétiques et les algues bleu-vert. La microstructure de cet appareil a été étudiée jusqu'au niveau accessible avec un microscope électronique; la figure 2 représente une telle microphotographie électronique.



Fig. 2. — Ultrastructure des chloroplastes.

L'aspect universel de ces structures ordonnées dans tous les systèmes photosynthétiques conduit à penser que la conversion quantique primaire se produit en phase quasi-cristalline. On est par suite autorisé à considérer le conversion quantique primaire en photosynthèse comme une opération photophysique plutôt que comme une opération photochimique.

Katz (1) en 1949 et, indépendamment, Bradley et Calvin (2) en 1955, ont suggéré que des agrégats de molécules de chlorophylle dans les chloroplastes pouvaient donner lieu à des bandes de conduction dans lesquelles les électrons et les trous produits par action de la lumière auraient la possibilité de se déplacer. Un tel système aurait l'avantage de permettre une séparation des entités oxydantes et réductrices reconnues nécessaires pour la photosynthèse.

Ce concept était demeuré purement spéculatif jusqu'à la publication, tout à fait récente, d'un certain nombre de recherches qui font penser qu'il se produit bien quelque chose de ce genre dans les chloroplastes. En 1956, Commoner et ses collaborateurs ont publié des preuves de l'existence d'une résonance de spin électronique induite par la lumière (qui sera désignée dans ce qui suit par ESR) dans les chloroplastes d'épinard, due à la photoproduction d'électrons non appariés (3). En 1957, ces chercheurs ont de nouveau montré la présence de deux sortes de spins non appariés, dont l'un se transforme en l'autre (4). En 1957, Arnold et Sherwood ont étudié des films de chloroplaste séché et ont trouvé qu'ils présentaient de la semi-conductivité et de la thermoluminescence (5). En outre, des études faites par Strehler et ses collaborateurs ont démontré l'existence de luminescences de longue durée, dépendant de la température, dans les algues et dans les chloroplastes (6, 7, 8, 9). Enfin on a observé la photoconductivité des films de chlorophylle (10).

Nos propres expériences dans ce domaine ont commencé en 1956 avec la démonstration par Sogo d'un signal ESR induit par la lumière dans des feuilles d'eucalyptus séchées. Comme ces résultats étaient d'une reproductibilité plutôt mauvaise, il a été décidé d'étudier des chloroplastes isolés (11). De plus, lorsqu'il devint manifeste que les signaux de résonance de spin disparaissaient assez rapidement lorsqu'on éteignait la lumière, la possibilité qu'une partie au moins de l'énergie associée à ces spins non appariés apparaisse sous forme de luminescence nous a conduit à étudier les propriétés d'émission de lumière des chloroplastes (12).

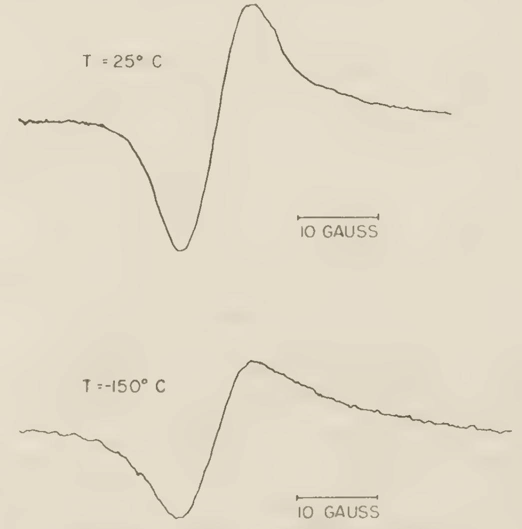


Fig. 3. — Signaux produits à la lumière par des chloroplastes entiers d'épinard.

Les chloroplastes sont préparés par broyage de feuilles d'épinard dans un mélangeur; on effectue ensuite toute une série de centrifugations différentielles (11). Cela nous permet d'obtenir ce que nous appellerons « chloroplastes intacts » et « fragments de chloroplastes grands et petits ».

La figure 3 représente quelques courbes typiques

de ESR pour des chloroplastes d'épinard entiers et humides. Ces courbes sont essentiellement les dérivées des fonctions représentant l'absorption de l'énergie de l'onde courte par l'échantillon en fonction de l'intensité du champ magnétique. Ces signaux représentent approximativement 10^{16} spins non appariés. Les longueurs d'onde de la lumière pouvant exciter ces signaux sont comprises entre 3 500 Å et 4 500 Å et entre 6 000 Å et 7 000 Å, ce qui indique une absorption par la chlorophylle. Une mesure grossière du rendement quantique donne une valeur comprise entre 0,1 et 1.

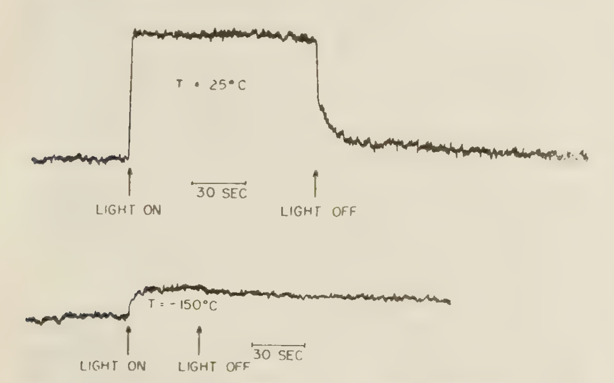


Fig. 4. — Courbes de temps de *croissance* et *décroissance* des chloroplastes entiers d'épinard à 25° et — 150 °C.

La figure 4 donne quelques résultats de mesures de temps de croissance et de temps de décroissance

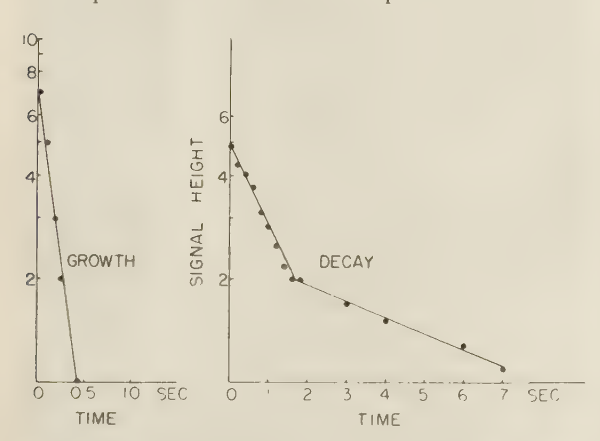


Fig. 5. — Analyse des courbes de *croissance* et de *décroissance* des chloroplastes d'épinard à 25 °C.

sur les échantillons. Dans ce cas les courbes représentent l'absorption d'énergie en fonction du temps pour une intensité de champ magnétique constante. Une analyse de la courbe de décroissance à 25° (fig. 6) a donné les deux temps de décroissance de 1 seconde et de 10 secondes. A la température ambiante, le temps de croissance pour le signal produit par la lumière est inférieur au temps de réponse de l'appareil de détection (0,2 seconde). A — 150 °C on observe essentiellement le même temps de croissance mais le temps de décroissance est de l'ordre de quelques heures. Cet effet du refroidissement est tout à fait réversible. Avec des chloroplastes séchés à 25 °C, les temps de croissance sont semblables mais les temps de décroissance sont de l'ordre de quelques heures. Cependant à 60 °C le temps de décroissance de la matière séchée est de

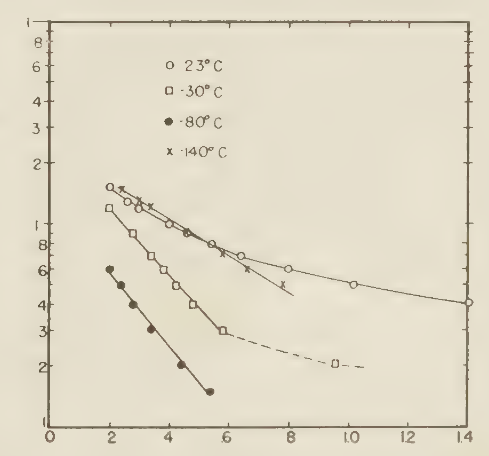


Fig. 6. — Courbes de *déclin* de la luminescence pour les chloroplastes entiers humides d'épinard à quatre températures.

l'ordre de quelques secondes. Le tableau I résume tous ces résultats.

La figure 7 montre quelques courbes de décroissance de la luminescence pour des chloroplastes d'épinard entiers et humides. L'appareil est conçu de façon à nous permettre d'observer de façon continue la lumière émise à partir des chloroplastes, environ 0,1 seconde après excitation par un éclair lumineux ([12]). Une analyse de ces courbes et de celles à des températures intermédiaires démontre que l'émission à température ambiante comporte au moins trois composants dépendant différemment de la température et ayant respectivement des durées de demi-vie de 0,15, 2 et 15 secondes. Approximativement 6 % de l'intensité de la lumière totale, jusqu'à environ 7 secondes après l'éclair, est due à l'émission de 0,15 seconde. Lorsque les chloroplastes sont refroidis, l'intensité du composant le plus lent diminue et disparaît à environ — 40 °C. A cette température, la courbe de décroissance est la même que celle obtenue en soustrayant les composants plus lents de la courbe à la température ambiante. Lorsqu'on refroidit encore plus les chloro-

plastes, le composant de 0,15 seconde diminue d'intensité, sa constante de temps restant apparemment à peu près la même; il disparaît à — 100 °C environ.

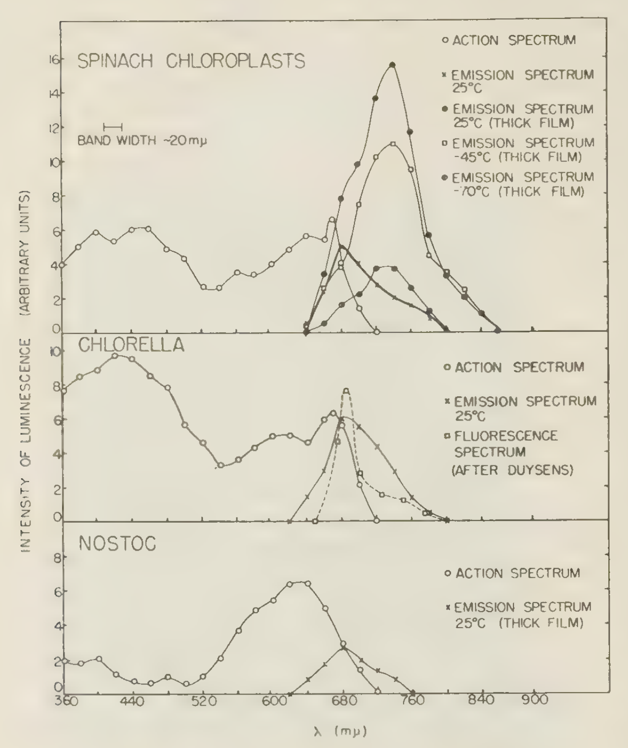


Fig. 7. — Spectres d'excitation et d'émission pour *chlorella*, les chloroplastes d'épinard et *Nostoc*.

A — 90 °C environ, une quatrième émission commence à apparaître et augmente graduellement d'intensité jusqu'à la température de l'azote liquide. Cette émission a une durée de demi-vie d'environ 0,3 seconde. Ces effets de refroidissement sont complètement reversibles. Les fragments de chloroplaste d'épinard petits et grands se comportent tous deux de façon semblable.

Les spectres d'excitation et d'émission de luminescence ont été mesurés, en se servant d'un monochromateur à réseau Bausch et Lomb, entre la lampe à éclair et l'échantillon et entre l'échantillon et le détecteur ([13]). Les courbes sont représentées sur la figure 7. Les spectres d'action pour *Chlorella* ([6]) et pour les chloroplastes d'épinard sont tout à fait semblables aux spectres d'absorption de ces objets. D'autre part, le spectre d'action pour *Nostoc* montre une activité relativement faible pour la chlorophylle et les caroténoïdes et une forte activité pour la phycocyanine. Ainsi il peut y avoir transfert d'énergie d'excitation électronique, avec un certain rendement, des caroténoïdes à la chlorophylle dans *Chlorella* et dans les chloroplastes d'épinard, mais un tel transfert ne se produit que très faiblement dans *Nostoc*.

Les spectres d'émission à température ambiante de films minces de *Chlorella* ([14]) et de chloroplastes démontrent que la luminescence est le résultat d'une transition entre le premier état excité de singlet et l'état fondamental de la chlorophylle. La forme légèrement élargie des spectres de luminescence par rapport au spectre typique de fluorescence est due aux largeurs relativement grandes de la fente du monochromateur qui sont nécessitées par la faiblesse de l'intensité de la luminescence. Des expériences avec filtre montrent que les émissions de 0,15, 2 et 15 secondes ont toutes la même distribution spectrale.

Dans une publication antérieure ([12]), on avait essayé de suggérer, sur la base de mesures avec des filtres sur des films épais de matière, que la luminescence des chloroplastes d'épinard était le résultat d'une émission de l'état triplet à l'état fondamental de la chlorophylle. On sait maintenant qu'elle est due pour une large part à la distorsion d'auto-absorption du spectre d'émission.

On a porté sur la figure 7 les spectres d'émission pour des films épais de chloroplastes d'épinard à trois températures. On a utilisé des films épais afin de compenser la faible intensité des émissions à basse température (voir ci-dessus). La forme nettement différente de ces spectres, comparativement aux spectres de film mince, est due à l'auto-absorption. On voit cependant que, pour les trois températures, ces courbes ont des formes identiques, ce qui fait penser qu'elles sont le résultat de la même transition électronique. Le fait que le spectre d'émission soit indépendant de la température indique que l'état triplet de la chlorophylle n'est pas impliqué du tout dans l'émission lumineuse retardée des chloroplastes d'épinard.

La luminescence de *Nostoc* est beaucoup plus faible que celle de *Chlorella* ou des chloroplastes d'épinard, ce qui exige l'emploi de films épais de substance. On devrait donc s'attendre, si l'émission n'était due qu'à la chlorophylle seule, à ce que le spectre soit semblable à ceux obtenus avec des films épais de chloroplastes. Mais, en fait, ce n'est pas le cas. Cela suggère qu'une portion notable de la lumière émise provient de la phycocyanine (qui a un maximum de fluorescence à environ 660 mμ) et subit une auto-absorption dans la couche épaisse.

Des expériences analogues utilisant des filtres de verre Corning à la place du monochromateur montrent que l'émission à basse température de 0,3 seconde des chloroplastes n'est excitée que par des longueurs d'onde comprises entre 3 500 Å et 4 500 Å (la lumière de longueurs d'onde comprises entre 6 000 Å et 7 000 Å n'a pas d'effet), et que cette émission est constituée

par des longueurs d'onde comprises entre 10 000 et 12 000 Å.

La figure 8 montre les effets obtenus en abandonnant des chloroplastes fraîchement préparés dans l'obscurité à 23 °C. Jusqu'à 8 h, la luminescence

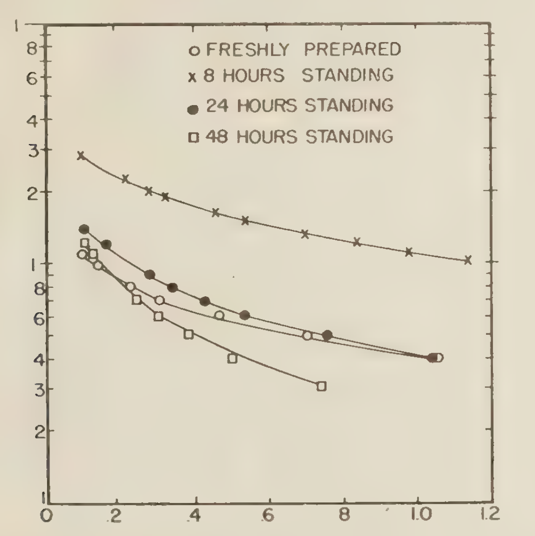


Fig. 8. — Effets obtenus en abandonnant dans l'obscurité à 23 °C des chloroplastes humides d'épinard fraîchement préparés.

augmente graduellement et atteint un intensité maximum qui est 2,7 fois celle du matériel fraîchement préparé. Ce plus grand signal présente la même courbe de décroissance, les mêmes propriétés de longueurs d'onde et le même comportement à la température que le signal originel. Si on laisse les chloroplastes plus longtemps dans l'obscurité, il se produit une diminution de l'intensité de luminescence et des modifications dans la courbe de décroissance. Après 72 h environ la luminescence a complètement disparu et les chloroplastes présentent une thermoluminescence semblable à celle observée par ARNOLD et SHERWOOD pour les chloroplastes séchés rapidement ([5]).

Tandis qu'il n'est pas possible de comparer quantitativement les résultats de ESR avec les résultats de luminescence au même moment, il y a qualitativement un certain nombre de ressemblances importantes (elles sont résumées dans le tableau I) :

a) Les deux phénomènes sont excités par les mêmes bandes de longueurs d'onde et sont tous deux dus à l'absorption par la chlorophylle.

b) Les temps de décroissance à 25 °C pour les chloroplastes humides sont du même ordre de grandeur pour les deux phénomènes.

c) A — 140 °C les temps de décroissance de ESR sont de l'ordre de quelques heures et on ne peut détecter aucune luminescence (une luminescence ayant un temps de décroissance de l'ordre de quelques heures ne serait pas détectable avec l'appareil utilisé dans nos études).

d) A 25 °C le temps de décroissance de ESR pour les chloroplastes séchés est de l'ordre de quelques heures et, dans des conditions semblables, les chloroplastes ne donnent pas de luminescence.

e) A 60 °C le ESR des chloroplastes séchés a un temps de décroissance de l'ordre de quelques secondes. A cette même température, nous avons observé un maximum de la thermoluminescence des chloroplastes séchés.

Les similitudes que nous venons de mentionner suggèrent fortement que l'émission de lumière à 6 000-8 000 Å des chloroplastes est, au moins en

TABLEAU I

Comparaison de l'ESR et des observations de luminescence pour les chloroplastes.

Matériel	T (°C)	Signal lumineux de ESR relatif	Temps de croissance ESR (**)	Temps de croissance 600-800 mμ Luminescence (**)	Temps de décroissance ESR (**)	Temps de décroissance 600-800 mμ Luminescence (**)
—	—	—	—	—	—	—
Chloroplastes frais humides	25	3	< 0,2 s (*)	< 0,1 s (*)	< 1 s (*) (60 %) 10 s (40 %)	0,15 s (6 %) 2 s (94 %) 15 s
	— 35	9	< 1 s (*) (75 %) 12 s (25 %)	< 0,1 s (*)	< 1 s (*) 33 %) 10 s (33 %) 3 mn (33 %)	0,15 s (75 %) 2 s (25 %)
	— 140	4	< 1 s	pas de signal	~ h	pas de signal
Chloroplastes séchés	25	—	~ mn	pas de signal	~ h	pas de signal
	60	—	~ s	—	~ s	~ s

(*) Excité par des longueurs d'onde comprises entre 350 et 450 mμ ou 600 et 700 mμ.
(**) Limité par les instruments.

partie, le résultat de la décroissance de certains des spins non appariés détectés par les essais de ESR. Le fait que l'émission lumineuse à — 35 °C est plus faible qu'à la température ambiante indique que certains radicaux disparaissent par des processus non-luminescents. Nous sommes maintenant en train de faire une comparaison quantitative des rendements quantiques, des spectres d'action et de la constante cinétique de ces deux phénomènes. Cela nous permettra de fixer de façon plus définie les relations qui existent entre eux.

Il y a quatre mécanismes possibles pour la production d'ESR ou d'émission lumineuse retardée dans les systèmes du type étudié ici. Ce sont :

1) La production de radicaux par photodissociation directe d'une simple liaison comportant la migration des fragments, suivie de leur recombinaison dans l'obscurité.

2) L'excitation et la décroissance d'un état de triplet.

3) La photosensibilisation réversible de processus chimiques ou enzymatiques conduisant à la production de radicaux libres.

4) La production d'électrons piégés dans un réseau quasi-ordonné.

Le mécanisme (1) est incompatible avec les considérations suivantes. Il n'existe aucune liaison chimique stable naturelle pouvant être dissociée par une lumière de 6 000-7 000 A. En outre, des temps de décroissance de l'ordre de quelques secondes ne sont pas de l'ordre de grandeur de ceux auxquels on pourrait s'attendre pour les recombinaisons de radicaux à des températures relativement élevées. Enfin, il est difficile de concilier un tel mécanisme avec l'existence de trois émissions séparées de même longueur d'onde.

L'excitation et la disparition d'un état de triplet de longue durée de vie, selon le mécanisme (2), est incompatible avec le fait observé que la luminescence du chloroplaste dépend nettement de la température, c'est-à-dire qu'il est très improbable qu'en abaissant la température à — 140 °C on accroisse la durée de vie du triplet jusqu'à l'ordre de quelques heures, ainsi que l'exigent les études de résonance de spin et aussi le fait qu'on ne peut observer aucune émission de triplet. En outre, un tel mécanisme ne pourrait donner trois actes d'émission séparés ayant des constantes de temps différentes mais de même longueur d'onde.

En refroidissant jusqu'à — 140 °C on devrait réduire à zéro les vitesses de tous les processus chimiques ou enzymatiques qui se produiraient d'après le mécanisme (3). Donc on ne peut considérer que les spins non appariés, qui sont produits à cette température, aient pris naissance de cette façon. D'autre part, les résultats de ESR à — 35 °C, c'est-à-dire l'apparition d'un temps de croissance de 12 secondes, font penser qu'une partie des radicaux formés à cette température et à la température ambiante est due à des transformations chimiques. Le plus grand signal de spin à — 40 °C peut s'expliquer en supposant que le coefficient de température de la disparition de ces radicaux produits chimiquement est plus grand que celui de leur formation.

Les considérations suivantes peuvent permettre de conclure que certaines décroissances sont associées à des réactions chimiques et d'autres à un mécanisme purement physique. La présence de l'émission de 0,15 seconde à une température aussi basse que — 100 °C élimine la participation de processus enzymatiques à chacune des transformations directe et inverse. Si donc seule l'émission de 2 secondes représente un processus chimique, on devrait s'attendre à ce que le refroidissement, en empêchant la réaction de production de radicaux, provoque l'apparition de quantités plus grandes d'énergie sous la forme d'une disparition de l'émission de 0,15 seconde. En fait l'émission à — 80 °C est inférieure à celle à la température ambiante. Un tel point de vue est confirmé par les expériences de vieillissement mentionnées antérieurement. Donc, si l'on suppose que le processus de vieillissement comporte l'inactivation d'enzymes, il devrait y avoir réduction des centres (ou radicaux) créés par voie enzymatique pour le processus d'émission de 2 secondes. Cette réduction des processus en compétition devrait alors conduire à un accroissement de l'intensité de l'émission de 0,15 seconde avec diminution concomitante de l'intensité de l'émission de 2 secondes. En fait, pour des périodes de vieillissement allant jusqu'à 8 h, ces deux intensités d'émission sont accrues dans la même proportion.

Il ne nous reste donc plus que le mécanisme (4), comme explication la plus plausible pour le processus primaire du phénomène dont il est question dans cet article. Nous allons voir dans quelle mesure un tel schéma s'accorde avec les données expérimentales.

La figure 9 est une représentation schématique des bandes d'énergie électronique dans les chloroplastes. Dans la mesure où la largeur de la bande est proportionnelle au carré de la probabilité de transition pour une transition de l'état fondamental à l'état excité [15], l'état de singlet excité doit être beaucoup plus large que l'état de triplet correspondant. Il peut donc y avoir une grande zone de recouvrement entre les niveaux d'énergie de ces deux états. Il est nécessaire de postuler un tel recouvrement, en vue d'aboutir à un passage entre les états qui soit relativement indépendant de la température,

pour rendre compte de ce qu'on n'a pu observer d'émission à l'état de triplet, même à — 70 °C.

De la lumière est absorbée et produit, dans un agrégat de molécules de chlorophylle, une transition de la bande de l'état fondamental à la bande du premier état excité de singlet. Les excitons à l'état de singlet peuvent alors subir l'un des trois processus concurrents suivants :

1) Ils peuvent retomber à l'état fondamental par la voie d'une émission de fluorescence ($\tau \simeq 10^{-9}$ sec).

2) Ils peuvent s'ioniser avec formation d'électrons et de trous dans les bandes de conduction ($\tau < 10^{-9}$ sec.) Des calculs ont montré qu'une telle durée de vie devrait permettre à l'exciton une migration de 100-1 000 molécules [16].

3) Ils peuvent passer par une transition sans radiaditon à l'état de triplet en des temps aussi courts que 10^{-12} sec.

Si la conversion à l'état de triplet est importante dans les chloroplastes, une ionisation dans les bandes de conduction peut se produire à partir de cet état. Les électrons et les trous dans la bande de conduction vont migrer et finalement être piégés en des points convenables du réseau. On a observé des durées de vie caractéristiques de 0,01-0,1 seconde dans de nombreuses expériences sur des substances photosynthétiques [2, 8, 11, 12]. Conformément à la présente hypothèse, cela représenterait le temps nécessaire pour la population des pièges. Si l'ionisation se produit à partir de l'état de singlet, cette constante de temps peut être identifiée avec la durée de vie de l'un des porteurs de charge dans la bande de conduction. Une telle hypothèse trouve quelque base dans le fait que, pour le germanium, on a calculé une durée de vie intrinsèque du porteur de charge mineur de 0,75 seconde [17]. Expérimentalement, les durées de vie pour les semi-conducteurs minéraux vont de 10^{-13} secondes à plusieurs secondes [18]. Aucune mesure correspondante n'a été faite pour les semi-conducteurs organiques. Si, d'autre part, l'ionisation se produit à partir de l'état triplet, la constante de temps de 0,01-0,1 seconde peut représenter soit la constante de temps de l'ionisation, soit la durée de vie du porteur.

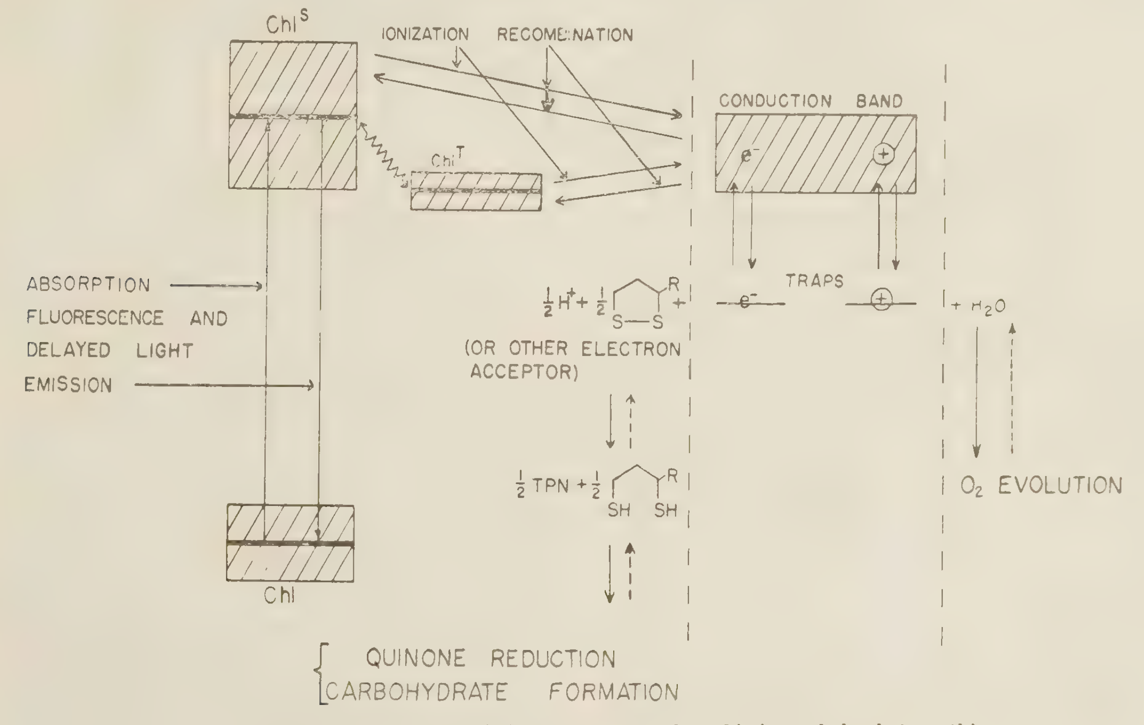


Fig. 9. — Schéma proposé pour différents processus photochimiques de la photosynthèse.

Il n'est pas possible, pour l'instant, de décider lequel des deux mécanismes, ionisation directe à partir de l'état de singlet ou ionisation à partir de l'état de triplet, se produit effectivement dans les chloroplastes. En fait, il se peut que les deux processus se produisent simultanément.

Le nombre des pièges dans le chloroplaste est probablement très petit, peut-être de l'ordre de un pour plusieurs milliers de molécules de chlorophylle.

Donc, ce schéma conduit directement à l'idée d'une « unité photosynthétique » ([19]). Les électrons et trous qui sont piégés donnent naissance à un signal de résonance de spin. Les pièges sont dépeuplés thermiquement, les électrons et trous résultants dans la bande de conduction se recombinent et il en résulte une luminescence qui dépend de la température. Une telle recombinaison peut se produire dans l'état de singlet soit directement soit par l'intermédiaire de l'état de triplet. Les émissions ayant une durée de vie de 2 et 15 secondes peuvent être identifiées avec la dépopulation de pièges à différentes profondeurs. La décroissance de l'émission de 0,15 seconde peut représenter soit la dépopulation d'un piège peu profond ou la durée de vie de l'un des porteurs de charge dans la bande de conduction. D'autres expériences sont en cours pour déterminer la nature de l'émission de 0,15 seconde de même que celle de 0,01 seconde que rapportent ARTHUR et STREHLER ([8]).

A basse température, l'énergie thermique est insuffisante pour exciter les électrons et trous de façon à les faire sortir des pièges et il ne se produit plus de formation enzymatique ni de disparition de radicaux. Il en résulte la disparition de la luminescence et l'apparition d'un signal ESR de longue durée de vie. La thermoluminescence, dont nous avons parlé antérieurement, peut être due au fait que les niveaux des pièges deviennent plus profonds par séchage.

Les électrons et trous dans les pièges peuvent aussi être utilisés à des processus enzymatiques. Toute réversibilité de ces processus enzymatiques conduirait alors à une luminescence de longue durée que l'on pourrait classer comme chimiluminescence. Il est probable que certaines des émissions de plus longue durée de vie, que rapportent STREHLER et ses collaborateurs ([6, 7]) sont de cette nature, et peut-être aussi l'émission de 15 secondes dont nous avons parlé ici. Si ces processus enzymatiques comportent des radicaux libres, il se produira des temps de décroissance semblables dans l'analyse de la résonance de spin. Le fait que, dans les chloroplastes vieillis il y ait émission de presque trois fois plus d'énergie, sous forme de lumière, que dans les chloroplastes frais fait penser que ces enzymes sont facilement inactivés. Un accroissement semblable du nombre de radicaux induits par la lumière dans les chloroplastes vieillis a été mis en évidence dans des expériences de résonance de spin. Ces observations suggèrent que l'utilisation enzymatique représente la voie normale pour la plupart des électrons et des trous dans la cellule vivante. C'est de cette façon que l'énergie lumineuse pourrait être rendue disponible pour le mécanisme de la photosynthèse.

BIBLIOGRAPHIE

(1) E. KATZ dans *Photosynthesis in Plants*, par W. E. LOOMIS et J. FRANCK. — (*Iowa State College Press*, Ames, Iowa, 1949), chapitre XV, p. 291.
A. SZENT-GYORGYI. — Dans une publication antérieure (*Science*, 1941, **93**, 609) a parlé du rôle possible de « bandes de conduction » de protéines dans la photosynthèse, mais ce concept ne correspond pas au système d'électrons π qui est ici discuté.
(2) D. F. BRADLEY et M. CALVIN. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1955, **41**, 563.
(3) B. COMMONER, J. J. HEISE et J. TOWNSEND. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1956, **42**, 710.
(4) B. COMMONER, J. J. HEISE, B. B. LIPPINCOTT, R. E. NORBERG, J. V. PASSONEAU et J. TOWNSEND. — Science, 1957, **47**, 126.
(5) W. ARNOLD et H. K. SHERWOOD. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1957, **43**, 105.
(6) B. L. STREHLER et W. ARNOLD. — *J. Gen. Physiol.*, 1951, **34**, 809.
(7) B. L. STREHLER. — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1951, **34**, 239.
(8) W. E. ARTHUR et B. L. STREHLER. — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1957, **70**, 507.
(9) B. L. STREHLER et V. H. LYNCH. — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1957, **70**, 527.
(10) R. C. NELSON. — *J. Chem. Phys.*, 1957, **27**, 864.
(11) P. B. SOGO, N. G. PON et M. CALVIN. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1957, **42**, 387.
(12) G. TOLLIN et M. CALVIN. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S*, 1957, **43**, 895.
(13) G. TOLLIN, E. FUJIMIRO et M. CALVIN. — A paraître.
(14) W. ARNOLD et J. B. DAVIDSON. — *J. Gen. Physiol.*, 1954, **37**, 677.
(15) W. T. SIMPSON et D. L. PETERSON. — *J. Chem. Phys.*, 1957, **26**, 588.
(16) E. RABINOWITCH. — *J. Phys. Chem.*, 1957, **61**, 870.
(17) A. van ROOSBROECK et W. SHOCKLEY. — *Phys. Rev.*, 1954, **94**, 1558.
(18) A. ROSE dans *Atlantic City Conference on Photoconductivity*, John Wiley and Sons, Inc., New-York, 1956, p. 112.
(19) H. GAFFRON et K. WOHL. — *Naturwiss.*, 1936, **24**, 81, 103.

TRANSFERT D'ÉNERGIE ET PHOTOSYNTHESE

par Eugene RABINOWITCH et Seymour Steven BRODY.

[*Department of Botany, University of Illinois, Urbana.*]

Traduit par Mme J. Cyrot.

SOMMAIRE

Des mesures de la durée de vie de la fluorescence directe et de la fluorescence sensibilisée de pigments de plantes *in vitro* et *in vivo* sont discutées en relation avec les phénomènes (*a*) de migration de l'énergie par transfert répété par résonance dans des corps à chlorophylle *in vivo* et (*b*) de transfert d'énergie en un seul temps d'autres pigments à la chlorophylle *a*. Les mesures de durées de vie imposent une limite supérieure à la portée possible de la migration à l'état excité singlet. Ces limites ne sont que très peu compatibles avec l'hypothèse d'une « unité photosynthétique » de plusieurs centaines de molécules de chlorophylle; la contribution possible de l'état métastable de triplet à la migration de l'énergie reste à élucider. Le transfert d'énergie d'excitation des phycobilines à la chlorophylle *a* dans les algues rouges, qui a été prouvé par des études des spectres d'action de la fluorescence de la chlorophylle *in vivo*, est confirmé par l'observation d'un retard de temps d'environ 0,5 mμ sec entre la croissance de la fluorescence de la chlorophylle dans *Porphyridium* excité dans la région d'absorption prédominante de la chlorophylle et sa croissance dans la région d'absorption pratiquement exclusive par la phycoérythrine.

I. — Introduction.

En photosynthèse, il se produit une réaction photochimique par absorption de lumière dans un système condensé contenant plusieurs pigments à des concentrations élevées. Les bandes d'absorption et de fluorescence de ces pigments se chevauchent de façon considérable. Dans ces conditions, la théorie — de même que l'expérience — nous laisse supposer que l'énergie d'excitation électronique sera transférée par résonance d'une molécule de pigment à l'autre processus qui entrera en compétition plus ou moins importante avec les pertes de l'énergie d'excitation par fluorescence, conversion interne en chaleur et utilisation photochimique.

Deux types de processus de transfert sont réalisables — entre des molécules identiques et entre des molécules différentes. Dans le premier cas, le transfert peut être répété, et donner lieu à une *migration* de l'énergie d'excitation, par une sorte de mouvement Brownien (« promenade au hasard ») sur une distance beaucoup plus grande que la distance moyenne séparant deux molécules de pigment les plus proches. Dans le second cas, le transfert ne se produit qu'en un seul temps — l'énergie passe d'une molécule au niveau d'excitation le plus élevé à une molécule au niveau d'excitation le plus bas. Ce processus n'est pas réversible et il ne peut être répété que dans le cas où il y a encore un autre pigment ayant un niveau d'excitation encore plus bas. (Par exemple, dans les algues, l'énergie absorbée par une molécule de caroténoïde peut être transférée d'abord à la phycoérythrine, puis à la phycocyanine, et enfin à la chlorophylle.) Outre les problèmes de l'existence, de la portée et de l'efficacité des transferts d'énergie dans les deux types de cellules photosynthétisantes, il y a aussi la question connexe de la *signification* de ce transfert pour la cinétique de la photosynthèse. En raison des nombreux problèmes posés par le rendement extrêmement élevé avec lequel l'énergie de plusieurs quanta, absorbée dans des molécules de chlorophylle très séparées, peut être utilisée pour la réduction d'une seule molécule de CO_2, on est fortement tenté de suggérer que le transfert par résonance de l'énergie d'excitation entre les molécules de chlorophylle contribue à ce rendement; cette hypothèse est plausible, mais est difficile à démontrer par expérimentation directe.

Les transferts d'énergie entre les pigments *différents* sont, d'autre part, facilement mis en évidence par la *fluorescence sensibilisée*. Dutton, Manning et Duggar (1) ont les premiers découvert ce phénomène dans les plantes. Ils ont trouvé que la fluorescence de la chlorophylle *a* dans une diatomée peut être excitée, avec presque le même rendement, que la lumière soit absorbée par la chlorophylle elle-même ou par le fucoxanthol, le caroténoïde caractéristique des algues brunes et des diatomées.

2. Durée de vie de l'état singlet excité de la chlorophylle in vivo.

Au Laboratoire de Photosynthèse de l'Université de l'Illinois ont été effectuées plusieurs études tendant à élucider le stade physique et photochimique primaire de la photosynthèse, y compris les transferts d'énergie de la première et de la seconde espèce. Une de ces recherches, faite par le Dr Brody, comporte la mesure directe de la durée de vie de la chlorophylle au premier état singlet excité *in vivo*. La méthode a été décrite en détail (2); elle était basée sur l'enregistrement direct à l'oscilloscope de la croissance et de la décroissance de la fluorescence de la chlorophylle excitée par un bref éclat de lumière. Le temps de réponse nécessaire pour de telles mesures *in vivo* est de l'ordre de 10^{-9} sec.; on a pu l'obtenir en utilisant une petite lampe à décharge à hydrogène, mise au point à l'Université de l'Illinois par le Dr J. Malmberg (3), dans laquelle la décharge lumineuse s'éteint en 10^{-9} sec. par collisions.

Les résultats obtenus avec cet instrument pour la chlorophylle (et d'autres pigments) en solution ont été résumés ailleurs (4). Ici nous ne ferons que donner un tableau des *durées de vie moyennes* τ de la fluorescence de la chlorophylle *a* dans différents milieux (calculées en supposant que la décroissance est exponentielle — supposition qui exige encore confirmation).

Après que les résultats du tableau I eurent été publiés, Dmitrievsky, Ermolaev et Terenin (5) ont signalé dans une étude (faite au moyen d'un « fluoromètre de phase » de Bonch-Bruevich) une décroissance de fluorescence constante de la chlorophylle dans différents milieux, donnant pour la chlorophylle *a* 5,1 mμ sec., dans l'éther (ce qui concorde parfaitement avec les résultats de Brody !),

TABLEAU I

Constantes de décroissance de la fluorescence de la chlorophylle a dans différents milieux.

Milieu	τ
Éther éthylique	5,1 ± 0,4 mμ sec.
Méthanol	6,9 ± 0,4 mμ sec.
Benzène	7,8 ± 0,5 mμ sec.
Chlorella (algue verte)	1,6 ± 0,5 mμ sec.
Porphyridium (algue rouge)	1,5 ± 0,4 mμ sec.
Anacystis (algue bleu-vert)	1,2 ± 0,4 mμ sec.

5,0 mμ sec. dans l'éthanol et 4,9 mμ sec. dans le toluène. *In vivo*, ces auteurs russes ont trouvé $\tau = 0,6$ mμ sec. pour la chlorophylle dans *Elodea* (une plante supérieure aquatique), 1,0 mμ sec. dans une feuille de *Cyperus* et 1,6 mμ sec. dans les chloroplastes homogénéisés provenant des feuilles d'*Aspidistra elatior*. Les trois dernières valeurs mentionnées étaient pour une « faible » irradiation; on a trouvé qu'elles augmentaient (par exemple à 1,5 mμ sec. dans *Elodea*) lorsqu'on augmentait cinq fois l'intensité lumineuse. On sait que le *rendement* de fluorescence de la chlorophylle *a* dans les cellules vivantes augmente avec l'intensité lumineuse (cf. Latimer, Rabinowitch et Bannister) (6). Les mesures de τ de Brody ont été effectuées par éclat, avec de la lumière d'une intensité momentanée extrêmement élevée mais avec une intensité d'irradiation *moyenne* très faible (environ 6 erg/cm² sec). Il est probable que, dans ce cas, seule l'intensité moyenne compte, puisque les éclats étaient extrêmement brefs ($\sim 10^{-9}$ sec.). A chaque éclat, environ une molécule de chlorophylle pour $1,5 \times 10^6$ absorbait un quantum, et pendant l'intervalle d'environ 10^{-2} sec entre les éclats, toutes les conséquences chimiques de cette absorption devaient avoir disparu.

Les valeurs de τ obtenues dans notre laboratoire *in vivo* (1,2 à 1,6 mμ sec., selon le tableau ci-dessus) sont semblables à celles données par les auteurs russes pour *la plus forte* de leurs deux irradiations. Il semble donc y avoir un écart; bien que l'intensité absolue de l'irradiation utilisée dans le travail russe ne soit pas donnée. Leurs expériences ont été effectuées en lumière modulée dont l'intensité moyenne devait être beaucoup plus forte que dans notre étude.

3. Migration d'énergie entre les molécules de chlorophylle in vivo.

Une durée de vie réelle de l'ordre de 1 mμ sec de la chlorophylle *a in vivo*, trouvée dans les mesures ci-desus (comparée avec celle de l'ordre de 5 mμ sec *in vitro*) suggère que le rendement quantique de la fluorescence est cinq fois plus faible. Cependant, d'après Latimer (6), ce dernier rendement est ∼ 30 % pour la chlorophylle *a* dans l'éther, et 2 ou 3 % *in vivo*, selon l'intensité de la lumière excitatrice — et *non* de 6 %. Cette différence reste à élucider; elle peut être associée au fait que les cellules de Latimer étaient adaptées à une irradiation intense avant d'être utilisées pour la mesure de la fluorescence, tandis que les cellules de Brody n'étaient exposées à aucune lumière plus forte que celle de la mesure elle-même. On sait que pendant les premières secondes après une période d'obscurité, l'intensité de fluorescence des cellules vertes peut être 2, 3 fois plus forte qu'après adaptation à la lumière; il se peut que les cellules de Brody aient été de façon permanente à l'état « d'adaptation à l'obscurité ».

Nous pouvons supposer que les molécules de chlorophylle à l'état de singlet excité ont, *in vivo*, dans l'état « d'adaptation à l'obscurité » environ 1 mμ sec, et à l'état d'adaptation à la lumière, 0,3-0,5 mμ sec

pour transférer leur énergie d'excitation par résonance aux molécules voisines du même pigment. La largeur considérable de la bande d'absorption rouge principale de la chlorophylle *in vivo* suggère que le couplage de l'excitation électronique avec des vibrations dans l'état électronique excité *n'est pas* détruit par migration de l'énergie dans la cellule vivante. (L'attribution de cette largeur à des vibration dans l'état *fondamental* est en contradiction avec le fait que les bandes de la chlorophylle — *in vivo* ou *in vitro* — ne sont pas particulièrement nettes aux basses températures !) Si l'on considère cet argument comme convaincant, la durée de vie de l'excitation électronique des molécules de chlorophylle *in vivo* doit être suffisamment plus grande qu'une simple période de vibration (3×10^{-14} sec. pour un quantum de vibration de 1 000 cm^{-1}), pour que la surface de potentiel de l'état excité garde sa signification; en d'autres termes, cette durée de vie doit être $\geqslant 10^{-12}$ sec.

Cette estimation est basée sur la supposition que la largeur de la bande est due à un couplage du quantum d'excitation électronique nettement défini avec toute une variété de quanta de vibrations à l'état excité. On pourrait, cependant, considérer — déjà en solution, mais encore plus dans le complexe pigment *in vivo* — une autre cause de l'élargissement des bandes : une variation du quantum d'excitation électronique due à une différence locale dans l'état du pigment — différences dans l'arrangement des protéines, des molécules d'eau, etc., autour de la molécule de pigment, de même que des différences dans la façon dont les molécules de pigment s'agrègent. Si ces variations étaient le fait du hasard, elles ne favoriseraient pas la migration de l'énergie : dans ce cas, l'élévation du « plafond de temps », imposée par le couplage (dont nous avons fait ci-dessus l'hypothèse) avec des vibrations serait composée par le manque de résonance électronique entre les molécules de pigment dans des états différents. Pour obtenir un net résultat favorable, le mieux serait de supposer que les cellules contiennent tout un assortiment de complexes et d'agrégats de chlorophylle différents spectroscopiquement, avec toutes les molécules dans chaque complexe ou agrégat en résonance électronique, si bien qu'il y a une forte probabilité de migration de l'énergie dans chaque complexe ou agrégat.

Nous devons toujours garder à l'esprit cette possibilité, tout en continuant notre discussion sur la base de l'hypothèse plus habituelle que la largeur des bandes est due, *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*, au couplage d'un niveau d'excitation électronique net avec des vibrations intramoléculaires et intermoléculaires.

Pendant une durée de vie totale de 1 mμ sec, le quantum d'excitation peut faire $\leqslant 1\,000$ sauts, si son « temps de visite » à chaque molécule est — ainsi que nous l'avons supposé — $\geqslant 10^{-12}$ sec Le nombre de molécules différentes visitées dans une promenade au hasard sur 1 000 emplacements moléculaires sera considérablement $\ll 1\,000$, en raison des visites répétées aux mêmes endroits.

Dans l'état « adapté à la lumière », lorsque le « temps de promenade » total disponible ne peut être que $\sim 0{,}3$ mμ sec., la longueur maximum du trajet et le nombre des molécules différentes visitées seront proportionnellement plus faibles.

Ces résultats numériques sont peu compatibles avec l'hypothèse bien connue de « l'unité photosynthétique », selon laquelle plusieurs centaines ($\geqslant 200$) de molécules de chlorophylle *in vivo* forment une « unité », de telle façon qu'un photon adsorbé par l'une quelconque de ces molécules est disponible, par migration par résonance, à un seul « emplacement réactionnel ». Pour soutenir ce concept sans entrer en conflit avec les limitations de la durée de vie, la migration d'énergie par résonance pourrait peut-être être considérée non pas comme une « promenade au hasard » sur un millier d'endroits identiques au point de vue énergétique, mais comme un mouvement dirigé de façon préférentielle vers le lieu de la réaction. Ce dernier lieu peut être considéré comme un « piège à énergie » exerçant une attraction sur le quantum en mouvement, au moins à une distance égale à celle des endroits voisins les plus proches.

Les difficultés quantitatives de ce concept d'unité seraient minimisées en supposant une migration de l'énergie à *l'état de triplet métastable*. Les molécules de chlorophylle excitées qui n'émettent pas de fluorescence — et ceci veut dire 97-98 % de toutes les molécules excitées *in vivo* — sont probablement transférées en un état de triplet métastable, ^3Chl; et la question se pose de savoir si dans cet état (qui peut être à 30 kcal au-dessus de l'état fondamental et 10 kcal au-dessous de l'état excité) l'énergie d'excitation pourrait migrer sur des distances plus grandes que celles qu'elle a des chances de couvrir avant la conversion. La longue durée de vie de l'état de triplet (peut-être 10^{-3} sec) favorise la migration; mais l'interaction entre une molécule à l'état de triplet, ^3Chl, et une voisine non excitée à l'état de singlet, ^1Chl, est beaucoup plus faible qu'entre $^1Chl^*$ et ^1Chl, si bien que la probabilité de transfert est beaucoup plus faible. Lequel des deux facteurs — la durée de vie plus longue ou la probabilité plus faible de transfert de l'énergie — est plus important? cela dépendra des conditions spéciales. La migration à l'état du triplet a été observée par les chercheurs russes dans des cristaux mélangés d'hydrocarbures (7); mais l'arrangement des molécules de chlorophylle *in vivo*, bien que dense, n'est pas réellement cristallin (ainsi que le prouvent les spectres d'absorption donnés par Jacobs et ses collaborateurs) (8).

En résumé, la portée de la migration d'énergie entre les molécules de chlorophylle *in vivo* et son rôle

dans l'interprétation des phénomènes cinétiques qui ont donné naissance à la théorie de « l'unité photosynthétique » demeurent incertains et fournissent un sujet d'étude difficile mais passionnant.

4. Transfert d'énergie à la chlorophylle à partir d'autres pigments.

Nous manquons de place ici pour passer en revue les mesures de la fluorescence de la chlorophylle sensibilisée dans les cellules vivantes ([1, 9, 10]), qui, ont démontré l'existence d'un transfert d'énergie des caroténoïdes et phycobilines à la chlorophylle *in vivo* (de même que de la chlorophylle *b* à la chlorophylle *a* et entre les différentes formes de bactériochlorophylle dans les bactéries pourpres). Les facteurs de probabilité, allant de ∼ 100 % pour le transfert d'énergie de la chlorophylle *b* à la chlorophylle *a in vivo*, bien que d'environ 90 % pour le transfert d'énergie de la phycocyanine à la chlorophylle *a* dans les algues bleu-vert, 40-50 % pour celui des caroténoïdes à la chlorophylle dans *Chlorella* et ⩽ 20 % pour celui des caroténoïdes à la chlorophylle *a* dans les algues rouges (et bleu-vert) ont été tirés de telles expériences par Duysens (et autres). Des observations récentes faites par M. et S. Brody dans notre laboratoire suggèrent que les probabilités de transfert ne doivent pas être considérées comme constantes pour une paire donnée de pigments; elles varient avec les conditions physiologiques, c'est-à-dire avec la concentration relative des deux pigments et l'« adaptation » des cellules à de la lumière de diverses longueurs d'onde. M. Brody discutera ces résultats dans l'étude qu'il présente au présent symposium.

5. Preuves du transfert d'énergie dans Porphyridium.

Le transfert d'énergie d'excitation de la phycoérythrine à la chlorophylle dans l'algue rouge *Porphyridium* peut être démontré en comparant le temps de fluorescence de la chlorophylle *a* dans une algue rouge (*Porphyridium*) excitée par de la lumière absorbée pratiquement entièrement (ou dans une très grande mesure) par la phycoérythrine. On a utilisé ici le même dispositif expérimental que pour la détermination des constantes de décroissance de la fluorescence; mais au lieu d'observer la *décroissance* de la fluorescence après éclat de la lampe à hydrogène, on a suivi la *croissance* de la fluorescence au commencement de l'éclat.

La figure 1 montre le domaine de longueur d'onde (transmis par filtre Corning 2404) dans lequel on a enregistré la fluorescence de la chlorophylle (avec une faible contribution de la fluorescence de la phycocyanine); et deux régions spectrales utilisées pour l'excitation de la fluorescence — l'une transmise par filtre Corning 9782 (excitant à la fois la chlorophylle

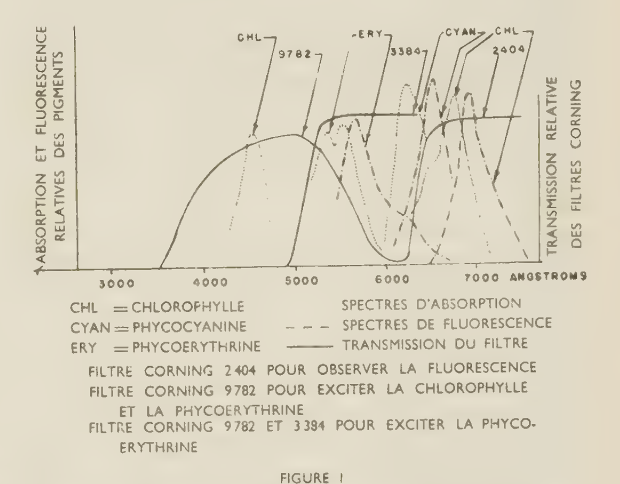


FIGURE 1

SPECTRES D'ABSORPTION ET DE FLUORESCENCE DES PIGMENTS IMPLIQUÉS DANS LES EXPÉRIENCES DE TRANSFERT D'ÉNERGIE; ÉGALEMENT TRANSMISSION DES FILTRES CORNING UTILISÉS POUR EXCITER ET OBSERVER LA FLUORESCENCE DANS PORPHYRIDIUM

et la phycoérythrine) et l'autre par les filtres Corning combinés 9782 et 3384 (n'excitant que la phycoérythrine). En surimposition sur cette courbe sont donnés les spectres d'absorption et de fluorescence de la chlorophylle *a*, de la phycocyanine et de la phycoérythrine, tels qu'ils ont été déterminés par French et coll. ([10]).

On a d'abord fait un oscillogramme de l'éclat de la lampe; puis, sans changer les paramètres des instruments, on a pris un oscillogramme de la fluorescence provenant des cellules rouges. La différence entre les longueurs des trajets optiques de l'éclat de la lampe et de la fluorescence était de l'ordre de 1 ou 2 cm., correspondant à un retard de temps de 6×10^{-11} sec (ce qui est inférieur au pouvoir de résolution des instruments). La figure 2 montre que la fluorescence était excitée par absorption à la fois dans la chlorophylle et la phycoérythrine; elle commençait pratiquement instantanément (dans les limites du temps de résolution de l'instrument) lorsque se produisait l'éclat de la lampe; la vitesse de croissance augmentait nettement, environ 0,2 mμ sec plus tard — probablement quand la fluorescence sensibilisée par la phycoérythrine (de la phycocyanine et de la chlorophylle) s'ajoutait à la fluorescence de la chlorophylle excitée directement. Lorsque seule

la phycoérythrine était excitée, il y avait un retard dans l'établissement initial de la fluorescence d'environ 0,5 mμ sec. Les courbes de la figure 2 ont été « normalisées » à la même hauteur maximum.

Le retard de la fluorescence sensibilisée par la phycoérythrine, observé dans *Porphydridium*, peut être

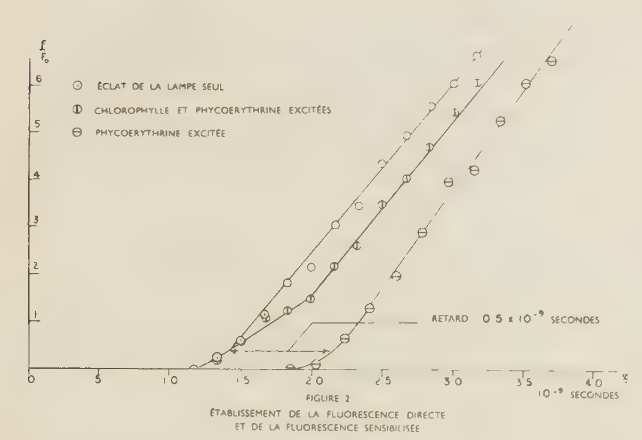


FIGURE 2

ÉTABLISSEMENT DE LA FLUORESCENCE DIRECTE ET DE LA FLUORESCENCE SENSIBILISÉE

interprété en considérant les durées de vie d'excitation connues des pigments en cause et les rendements connus de façon approximative avec lesquels l'énergie est transférée entre eux.

La durée de vie réelle de la fluorescence de la phycoérythrine (d'après les mesures faites dans notre laboratoire) *in vitro* est 7,1 mμ sec; dans *Porphyridium* d'après DUYSENS (9), le spectre d'action de la fluorescence suggère qu'environ 95 % de l'énergie absorbée par la phycoérythrine est transférée à la phycocyanine. Cela indique que la constante de temps pour ce transfert, τ_{tr}, et 0,37 mμ sec, (réduisant le rendement de fluorescence de la phycoérythrine de 85 % *in vitro* à ~ 4 % *in vivo*) :

$$\frac{5}{100} = \frac{1/\tau}{1/\tau + 1/\tau_{tr}}, \quad \text{ou avec } \tau = 7{,}1 \text{ m}\mu \text{ sec,}$$

$$\frac{1}{\tau_{tr}} = \frac{19}{7{,}1} = \frac{1}{0{,}37 \text{ m}\mu \text{ sec.}}$$

Cela explique grossièrement la distance (~ 0,2 mμ sec) qui existe entre les parties supérieures des deux premières courbes de la figure 2.

D'après DUYSENS, environ 80 % de l'énergie absorbée par la phycocyanine est transférée à la chlorophylle. La constante de temps de ce processus, déterminée de façon semblable à partir de la relation :

$$\frac{20}{100} = \frac{1/\tau}{1/\tau + 1/\tau_{tr}}, \text{ avec } \tau = 1{,}8 \text{ m}\mu \text{ (BRODY)}$$

est 0,45 mμ sec.

Cette évaluation donne 0,37 + 0,45 ~ 0,8 mμ sec pour le temps total nécessaire pour le transfert d'énergie de la phycoérythrine *via* la phycocyanine à la chlorophylle — ce qui est en bon accord avec le retard observé expérimentalement de 0,5 mμ sec (fig. 2). Cette dernière valeur est probablement une moyenne pondérée pour la transmission de l'énergie en partie à la phycocyanine et en partie à la chlorophylle, puisque la fluorescence mesurée avec le filtre Corning 2404 contient des composants dus aux deux pigments. Ainsi que nous l'avons déjà mentionné, le rendement du transfert d'énergie entre les pigments dans les algues rouges dépend probablement de la teneur spécifique en pigment et de leurs proportions (et d'autres propriétés physiologiques); il se peut qu'à cet égard les cellules utilisées par DUYSENS aient différé des nôtres. De plus, le retard observé (environ 0,5 mμ sec) est considérablement plus faible que la durée des temps de passage dans le tube du photo-multiplicateur (2,6 mμ sec); c'est pourquoi les mesures pourraient ne donner qu'un résultat approximatif.

Il a été montré (11) que la durée du temps de passage peut être réduite à 0,4 mμ sec en n'utilisant que le centre de la surface phototensible du photomultiplicateur. La perte d'intensité du signal due au fait que l'on masque une grande partie de cette surface pourrait être récupérée en augmentant l'intensité de l'éclat de lumière excitatrice et en améliorant la géométrie du système optique; c'est ce que nous projetons de faire.

L'amélioration du temps de résolution permettrait de déterminer séparément le temps du transfert d'énergie de la phycoérythrine à la phycocyanine et celui de la phycocyanine à la chlorophylle. Ces données, combinées avec les durées de vie de la fluorescence de ces pigments, permettraient de calculer les rendements de transfert indépendamment des évaluations de DUYSENS.

Dans toutes les études de transfert d'énergie surgit une difficulté : comment différentier le transfert d'énergie par résonance et la fluorescence secondaire qui se produit par réabsorption de la fluorescence « primaire » du donneur d'énergie pour l'accepteur d'énergie TERENIN, qui insiste sur ce point dans son article (7), a critiqué les conclusions de DUYSENS concernant le rendement du transfert d'énergie par résonance *in vivo*, pour la raison qu'il n'a pas tenu compte de la fluorescence secondaire. LAVOREL (12), dans une étude sur la migration de l'énergie dans des solutions de fluorescéine, a montré comment on pouvait reconnaître le transfert d'énergie et la fluorescence secondaire, en faisant varier les concentrations de colorant; mais la séparation quantitative des deux effets s'est révélée difficile.

Le problème est, cependant, plus facile lorsque l'on trouve un transfert à rendement élevé tandis que le rendement de la fluorescence primaire est

relativement faible et que la probabilité de réabsorption de la fluorescence primaire est $\ll 100$ %. Ce sont les conditions les plus fréquentes dans les cellules vivantes. Par exemple, les caroténoïdes sont en général présumées parfaitement non-fluorescents. Récemment, Brody a remarqué dans notre laboratoire que les cellules de *Chlorella* produisent une bande de fluorescence à 520 mμ, qui est probablement due aux caroténoïdes; mais son intensité est très faible comparativement à celle de la chlorophylle, c'est-à-dire que son rendement est < 3 %. Par conséquent lorsque nous trouvons des rendements compris entre 20 et 70 % pour le transfert d'énergie des caroténoïdes à la chlorophylle *in vivo*, nous pouvons être sûrs que le mécanisme principal de ce transfert *n'est pas* un mécanisme de fluorescence primaire et de sa réabsorption. Dans le cas du transfert d'énergie entre les chlorophylles *b* et *a*, le rendement de la fluorescence primaire est également beaucoup trop faible pour expliquer une efficacité de transfert approchant 100 % (en dépit du fait qu'une condition — efficacité de la réabsorption de la fluorescence primaire — est particulièrement favorable dans ce cas en raison du fort recouvrement de la bande de fluorescence de la chlorophylle *b* et de la bande d'absorption de la chlorophylle *a*.

La probabilité de fluorescence secondaire *in vivo* est maximum dans le cas de transfert d'énergie entre la phycoérythrine et la phycocyanine, et entre la phycocyanine et la chlorophylle, parce que le rendement de fluorescence intrinsèque des deux phycobilines est très élevé (85 % pour la phycoérythrine et 53 % pour la phycobiline, mesuré *in vitro*); et la réabsorption de leur fluorescence dans la cellule pourrait être importante. La réduction des rendements de fluorescence des phycobilines à quelques % *in vivo* a été attribuée ci-dessus au transfert d'énergie — mais nous nous demandons maintenant si elle ne pourrait pas être due en partie, aussi, à la réabsorption de la fluorescence dans la cellule (et sa réémission comme fluorescence de la chlorophylle). Mais, si l'on considère que la réabsorption de la fluorescence de la phycoérythrine par la phycocyanine, et celle de la fluorescence de la phycocyanine par la chlorophylle, dans les suspensions de cellules diluées utilisées, doivent être $\ll 50$ %, l'efficacité du transfert d'énergie par le mécanisme de réabsorption doit être < 40 % pour le transfert de la phycoérythrine à la phycocyanine, et < 25 % pour celui de la phycocyanine à la chlorophylle; — tandis que les efficacités de transfert observées sont de l'ordre de 90 %. Nous pouvons donc conclure que dans ce cas, également, la réabsorption de la fluorescence pimaire, tout en contribuant nettement à la fluorescence sensibilisée observée, *n'est pas* le mécanisme principal de sensibilisation; ce rôle doit être imputé au transfert d'énergie par résonance.

BIBLIOGRAPHIE

(1) H. J. Dutton, W. M. Manning et B. M. Duggar. — *J. Phys. Chem.* 1943. **47**, 308.
(2) S. Brody. — *Rev. Sci. Instr.*, 1957, **28**, 1021 *(sous presse)*.
(3) J. Malmberg. — *Rev. Sci. Instr.*, Déc. 1957 (in press).
(4) S. Brody et E. Rabinowitch. — *Science* 1957, **125**, 555.
(5) O.D. Dmitrievsky, V. Ermolaev et A. N. Terenin. — *Doklady Acad. Sci, URSS.*, 1957, **114**, (# 4), 1957.
(6) P. Latimer, E. Rabinowitch et T. T. Bannister. — *Science*, 1956, **124**, 585.
(7) A. N. Terenin et V. Ermolaev. — *Doklady Acad. Sci. URSS.*, 1952, **85**, 547;
V. Ermolaev. — *Izvest. Acad. Sci. URSS, Ser. fyz.*, 1956, **20**, 514;
Cf. aussi A.N. Terenin et V. Ermolaev. — *Uspekhi fyz. nauk*, 1956, **58**, 37.
(8) E. Jacobs, A. Holt et E. Rabinowitch. — *J. Chem. Phys.* 1954, **22**, 142.
(9) L.M.N. Duysens. — *Thèse.* Univ., Utrecht, 1952.
(10) C.S. French et V. K. Young. — *J. Gen. Physiol.*, 1952, **35**, 873.
(11) R.V. Smith. — *Photomultiplier Transit Time Measurements, Westinghouse Research Laboratories, Scientific paper* 60-94511-6-P6.
(12) J. Lavorel. — *J. Phys. Chem.*, 1957, 61, 864.

DISCUSSION

J. Lavorel. — A propos des différences de rendement de la fluorescence de la chlorophylle *in vivo* mesurées directement (Latimer) et calculées à partir de la durée de vie de fluorescence (Brody), il me paraît difficile d'accepter l'argument de E. Rabinowitch faisant intervenir un état d'adaptation à l'obscurité pour expliquer que le rendement calculé était 2 à 3 fois plus fort que le rendement mesuré. Au point de vue des conséquences photochimiques de l'excitation de la chlorophylle capables d'influer le rendement, ce qui compte principalement est l'intensité lumineuse moyenne équivalente à la succession des flashs ultracourts de Brody et non la façon dont l'énergie est répartie dans le temps.

L'autre possibilité signalée par E. Rabinowitch c'est-à-dire celle d'une hétérogénéité de la chlorophylle dont une partie serait fluorescente et l'autre non pourrait être une hypothèse plus plausible.

E. Rabinowitch — L'intensité moyenne de l'illumination dans les expériences de Brody était très basse (parce que les éclairs très intenses ne duraient que 10^{-9} secondes et étaient séparés par des périodes d'obscurité durant de l'ordre de 10^{-2} sec.). L'hypothèse suggérée est donc que des cellules adaptées à cette intensité moyenne possédaient un taux de fluorescence sensiblement égal à celui des cellules adaptée à l'obscurité. Néanmoins, moi aussi, je trouve la seconde hypothèse — celle de deux sortes de chlorophylle dans la cellule, l'une fluorescente et l'autre non fluorescente — plus attrayante.

E. C. Wassink. — Vous mentionnez les essais de Thomas sur le nombre de molécules de chlorophylle dans une unité photosynthétique au moyen de désintégration par étapes. J'ai toujours été frappé par l'élégance évidente de ces essais. Néanmoins depuis plusieurs années, je me suis toujours demandé si l'interprétation donnée était la seule possible.

Si nous faisons une suspension colloïdale de chlorophylle dans l'eau, l'interaction avec le milieu de suspension est si

forte que même la fluorescence est pratiquement abolie. Donc, en supposant que le grand complexe de grana portège beaucoup les molécules de chlorophylle de cette interaction, si l'on rend ces complexes de plus en plus petits, l'interaction augmentera jusqu'à un point où le transfert d'énergie au milieu deviendra plus probable qu'un transfert à toute autre sorte de « chimie ». J'aimerais connaître votre opinion sur ce sujet.

E. Rabinowitch — Je me demande si l'autre interprétation proposée par WASSINK pour les observations de THOMAS est satisfaisante du point de vue quantitatif. Les particules colloïdales de chlorophylle ne sont pas fluorescentes, même lorsqu'elles contiennent des milliers de molécules. Il serait néanmoins intéressant de répéter les expériences de THOMAS sur l'effet de la séparation progressive des particules sur leur activité de HILL, avec observation parallèle de la fluorescence.

S. Brody (à E. C. WASSINK). — Le Docteur. M BRODY, de l'Université d'Illinois, a observé une adaptation non chromatique de *Porphyridium cruentum* quand les cellules étaient cultivées sous lumière monochromatique de grande intensité (10^5 erg/cm² sec). Toutefois, quand on utilisait une lumière monochromatique d'intensité 10^2 erg/cm² sec pour cultiver les cellules, on observait une adaptation chromatique. Apparemment, une intensité lumineuse élevée empêche la formation de pigment causant l'absorption, tandis que de faibles intensités lumineuses stimulent la formation du pigment absorbant la lumière. De plus, la teneur totale en pigment est plus grande dans ces cellules que dans les cellules se développant sous de hautes intensités lumineuses.

A. N. Terenin. — *a*) *Questions* : Comment peut-on se représenter d'après vous la forme de la chlorophylle qui absorbe dans le *même* maximum spectral mais ne possède pas de fluorescence?

Quelle est la cause du décalage du maximum de la chlorophylle dans la feuille? Est-ce le résultat de l'agrégation ou d'une interaction avec la protéine?

b) *Remarque.* — E. RABINOWITCH et R. LIVINGSTON ont présenté des calculs à partir des forces des oscillateurs des transitions singlet-triplet qui semblent montrer que la probabilité de transfert de l'énergie entre les niveaux triplets des molécules est exclusivement peu probable en comparaison avec le transfert reconnu entre niveaux singlets. Mais leurs calculs étaient basés sur la supposition que le transfert intramoléculaire triplet-triplet est sujet aux mêmes facteurs que ceux qui sont valables pour l'induction par résonance causée par le couplage des champs électromagnétiques des oscillateurs. Or, nous avons montré dans notre mémoire que ce mécanisme est non valable pour le transfert triplet-triplet et que ce dernier se fait à proximité par reecouvrement des répartitions électroniques dans les molécules.

La distance entre les molécules de la chlorophylle dans les chloroplastes qui est, selon E. RABINOWITCH, de 10 Å est en parfait accord avec un transfert et une migration d'énergie entre niveaux triplets que nous avons déjà observés à des distances intermoléculaires de 13-15 Å. A ces distances l'efficacité de ce transfert peut atteindre 10 % et même plus. On ne doit pas négliger la possibilité que la migration aux niveaux triplets ait lieu dans la chlorophylle à l'état condensé; cette question doit être élucidée par des expériences.

E. Rabinowitch. —

a) *Questions.* — I. Les deux modifications de la chlorophylle suggérées dans une de nos deux hypothèses peuvent bien avoir des bandes d'absorption décalées l'une par rapport à l'autre, par disons 3-5 μm. Le contour de la bande « rouge » d'absorption dans la cellule vivante est assez large pour recouvrir plus d'une bande; DUYSENS a même déduit de cette largeur qu'il doit y avoir au moins deux bandes séparées.

2. Le décalage du maximum *in vivo* peut être dû ou bien à l'association de la chlorophylle avec la protéine ou avec quelque autre molécule du milieu, ou bien à l'association des molécules de la chlorophylle entre elles, ou bien aux deux phénomènes.

b) *Remarque.* — Je suis d'accord avec TERENIN sur le fait que la probabilité de transfert d'énergie à l'état de triplet est une fonction de la distance de forme différente de celle de la probabilité de transfert à l'écart de singlet, puisque l'une est due au recouvrement des fonctions propres de deux molécules voisines, et l'autre au couplage par champ électromagnétique. Une probabilité de 10 % d'un transfert triplet-triplet sur une distance de 13-15 Å n'est pas étonnante pour des molécules dont les dimensions sont de, disons, $4 \times 20 \times 20$ Å. Pourtant, pour interpréter l'unité phostosynthétique, on a besoin d'une probabilité de transfert beaucoup plus forte, permettant une migration moyenne à travers quelques centaines de molécules. Mes amis théoriciens ont refusé de me donner une réponse théorique à la question de savoir si l'arrangement probable des molécules de la chlorophylle dans le chloroplaste pouvait permettre une telle migration de l'état triplet. C'est donc, comme le suggère TERENIN, un problème à résoudre par voie expérimentale.

TRANSFERT D'ÉNERGIE ET STRUCTURE DU CHLOROPLASTE

par J. B. THOMAS, F. J. M. DAEMEN et A. SCHAAP

[*Biophysical Research Group, Physical Institute of the State University, Utrecht, The Netherlands.*]

Traduit par Jean LAVOREL

SOMMAIRE

On décrit des expériences indiquant l'existence d'un transfert d'énergie interlamellaire dans les chloroplastes.

Les résultats suggèrent que, dans les chloroplastes d'Epinard, les pigments photosynthétiques sont situés à la surface extérieure des lamelles doubles des grana.

Introduction.

Dans les organites photosynthétiques des plantes autotrophes, l'énergie lumineuse est absorbée et partiellement transformée en énergie chimique. Cette dernière est utilisée pour la réduction du gaz carbonique en hydrates de carbone. L'absorption photosynthétique de la lumière est le fait des pigments principaux, les chlorophylles, ainsi que des pigments accessoires, les caroténoïdes et, chez les algues rouges et bleues-vertes, également les phycobilines, phycocyanine et phycoérythrine.

DUTTON, MANNING et DUGGAR (1943) et, indépendamment, WASSINK et KERSTEN (1946) ont observé que, chez les Diatomées, la lumière absorbée par le fucoxanthol, un caroténoïde, est aussi efficace pour la photosynthèse que la lumière absorbée par la chlorophylle. En étudiant la fluorescence de la chlorophylle, ils démontrèrent que l'énergie absorbée par le flucoxanthol pénètre dans la chaîne des processus chimiques exclusivement par l'intermédiaire de la chlorophylle. Ce qui signifie que le transfert de l'énergie de l'excitation électronique — appelé plus simplement « transfert d'énergie » — se produit entre ces derniers pigments. Ces résultats ont été confirmés par TANADA (1951). On a également constaté que la lumière absorbée par les caroténoïdes autres que le fucoxanthol était active pour la photosynthèse, cf. EMERSON et LEWIS (1942, 1943), HAXO et BLINKS (1950), THOMAS (1950), et CLAYTON (1953). Mais le rendement du transfert d'énergie entre ces caroténoïdes et la chlorophylle est moins élevé que dans le cas du fucoxanthol et de la chlorophylle. EMERSON et LEWIS (1941, 1942), HAXO et BLINKS (1946, 1950), VAN NORMAN, FRENCH et MAC DOWALL (1948), ARNOLD et OPPENHEIMER (1950), FRENCH et YOUNG (1952) ont trouvé que le transfert d'énergie entre les phycobilines et la chlorophylle avait un excellent rendement. Dans les deux dernières publications citées ci-dessus, le mécanisme de transfert d'énergie était considéré comme étant probablement un phénomène de résonance inductive, cf. FOERSTER (1951). Une étude quantitative et détaillée chez différents organismes fut entreprise par DUYSENS (1952). En plus des transferts dont nous venons de parler, cet auteur étudia également les transferts entre les chlorophylles, ou entre des types de complexes bactériochlorophylleprotéine, et observa des rendements de transfert d'environ 100 %. Un rendement aussi élevé indique que l'énergie d'excitation est très probablement transférée par résonance inductive uniquement. L'énergie d'excitation pénètre dans les processus photosynthétiques sombres des plantes exclusivement par la voie de la chlorophylle *a*, cf. également FRENCH et YOUNG (1952), ou, chez les bactéries, par la voie de la bactériochlorophylle de type B 890.

In vivo, les pigments photosynthétiques sont liés à un support protéique. Pour une discussion et une revue de la littérature concernant ces complexes, le lecteur peut consulter RABINOWITCH (1945, 1951, 1956). Pour le présent, nous mentionnerons seulement ce qui suit. Très probablement, la formation de ce complexe est responsable du déplacement ainsi que de l'élargissement des bandes d'absorption. Ce dernier effet augmente le degré de chevauchement des spectres d'absorption des pigments en question et, de la sorte, facilite les transferts d'énergie. Une propriété très importante de ces complexes est de permettre aux pigments photosynthétiques insolubles dans l'eau de fonctionner dans le milieu aqueux de la cellule.

Les complexes pigment-support n'existent pas à l'état libre dans la cellule vivante. Ils sont concentrés dans des organites distincts. Ces structures peuvent être construites de différentes manières, mais la partie qui contient le pigment est toujours constituée de lamelles. Chez les plantes terrestres et la plupart des plantes aquatiques, ces organites sont les chloroplastes. Il existe dans la littérature un bon nombre de mises au point concernant la question des chloroplastes, par exemple, RABINOWITCH (1956), LEYON (1956) et THOMAS (1955).

D'une manière générale, on distingue deux types de chloroplastes : les chloroplastes granulaires et les chloroplastes lamellaires. Le premier type qui est caractéristique des plantes dites « supérieures » contient des structures colorées, les grana, enveloppées dans la distance d'un stroma incolore. Les grana sont constitués de lamelles protéiques alternant avec des couches de lipides. Les chloroplastes lamellaires, par exemple ceux qu'on observe chez certaines algues, contiennent des lamelles très probablement pigmentées uniformément à travers toute leur surface. Il faut ajouter que des types intermédiaires existent également, cf. BUTTERFASZ (1957), CHARDARD et ROUILLIER (1957).

D'après THOMAS, POST et VERTREGT (1954), il est très vraisemblable que les complexes des (lipo) protéines avec la chlorophylle, et probablement aussi avec les autres pigments photosynthétiques, sont localisés dans, ou à la surface des lamelles. Cette conclusion repose sur le fait que des fragments de telles lamelles sont capables d'accomplir la photolyse de l'eau sensibilisée par la chlorophylle, ou réaction de HILL, cf. THOMAS, BLAAUW et DUYSENS (1953). Les dimensions des fragments les plus petits encore actifs au point de vue de la réaction de HILL coïncident à peu près avec celles des globules observées au microscope électronique, et qui, d'après FREY-WYSSLING et STEINMANN (1953), sont très probablement des macromolécules lipoprotéiques représentant les unités structurales des lamelles.

Ainsi, d'une manière ou d'une autre, les molécules de pigments photosynthétique semblent exister en combinaison avec les unités constituant les lamelles minces. D'après GOEDHEER (1957), il est probable que les noyaux porphyrine des molécules de chlorophylle sont orientés préférentiellement, quoique faiblement, dans le plan des lamelles. De plus, cet auteur a obtenu certaines indications selon lesquelles, optiquement parlant, les molécules de chlorophylle constituent une couche d'une épaisseur à peu près du même ordre de grandeur que les noyaux porphyrine de ces molécules.

On peut se demander si les transferts d'énergie se produisent seulement dans chaque couche, isolément, ou bien également entre couches adjacentes. Pendant le travail mentionné ci-dessus au sujet de la réaction de HILL de fragments de lamelles par THOMAS et coll. (1953), il se dégagea l'impression qu'un tel transfert d'énergie interlamellaire pourrait bien se produire. Dans ce travail, les lamelles avaient été séparées les unes des autres par des vibrations de 7 000 Hz provenant d'un oscillateur à magnétostriction. L'action prolongée des vibrations provoque la fragmentation des lamelles isolées. L'étude des préparations au microscope électronique et de leur activité pour la réaction de HILL suggéra que, au moment où les lamelles étaient séparées les unes des autres, leur activité tombait à 70 %. Une désintégration poussée plus loin provoquait une diminution des dimensions des fragments lamellaires sans réduction de leur activité photochimique, jusqu'à ce que soit atteinte une taille critique au-dessous de laquelle l'activité photochimique diminuait rapidement jusqu'à zéro. Puisque l'objet de ce travail était l'étude des fragments de taille « critique », un petit nombre d'expériences seulement furent menées avec des suspensions soumises à une légère action des vibrations. Les résultats obtenus furent trop peu nombreux pour être pris en considération dans la publication mentionnée. L'article présent rend compte d'une étude au cours de laquelle ces expériences furent répétées et étendues au cas des chloroplastes granulaires et lamellaires en vue de considérer la possibilité d'un transfert d'énergie interlamellaire.

Méthodes.

Préparation des suspensions de chloroplastes. — Des feuilles d'épinard étaient lavées à l'eau du robinet, puis avec une solution de tampon phosphate M/20, pH 6, 5, à laquelle avait été ajouté 0,05 % de chlorure de potassium. Les feuilles étaient alors exprimées dans une presse à tissus du type décrit par THOMAS, MINNAERT et ELBERS (1956) et le jus était aussitôt repris dans la même solution tampon. La presse et la solution tampon étaient refroidies à l'avance dans un réfrigérateur. La suspension obtenue était filtrée sur du coton.

Les feuilles d'*Aspidistra* étaient traitées de la même façon sauf que du saccharose à la concentration de M/2 était ajouté à la solution tampon. Le procédé d'extraction était également différent : à cause de la résistance mécanique des feuilles, une « multipress » Braun pré-refroidie était utilisée à la place de la presse à jus mentionnée précédemment.

Des thalles de l'algue marine *Fucus vesiculosus* furent également broyées dans la « multipresse ». Par suite de la haute viscosité du mélange résultant jus-solution tampon, cette suspension ne pouvait

être filtrée sur coton, mais était pressée à travers du tissu de nylon. Nous remercions la Station Zoologique Marine à Den Helder pour ses envois hebdomadaires de matériel frais.

Les suspensions étaient divisées en deux parties, chacune d'environ 10 cm³. Les récipients étaient disposés sur de la glace et l'oxygène était enlevé en faisant passer pendant 10 minutes un courant d'azote « extra » pré-refroidi, purifié par passage sur du fil de cuivre chauffé. L'un des échantillons servait de témoin, tandis que l'autre subissait la désintégration par vibration. Autant que possible, on faisait en sorte que les deux échantillons soient soumis aux mêmes conditions. Tous deux étaient maintenus sur la glace pendant le transport au désintégrateur et retour. Pendant la désintégration, l'échantillon témoin était exposé à la température ambiante. Autant que possible, les préparations étaient maintenues à l'obscurité; si nécessaire, on n'utilisait seulement de la lumière de faible intensité.

Procédé de désintégration. — Les suspensions étaient soumises à l'action des vibrations dans un oscillateur à magnétostriction opéré à la fréquence de 7 000 Hz. Pour une description de l'appareillage, le lecteur pourra consulter la publication de Thomas et coll. (1953). Le procédé était rendu beaucoup plus efficace en refroidissant les parois du bol de l'oscillateur au lieu de disposer un serpentin réfrigérant à l'intérieur du bol, et par un meilleur ajustage du barreau vibrant. Par conséquent, l'effet des temps de vibration utilisés présentement ne devront pas être comparés avec ceux de l'étude précédente. Dans l'article mentionné, nous avons décrit des expériences de contrôle montrant que le procédé de vibration, conduit en présence d'azote pur, convient à notre propos.

Nous remercions le Dr J. A. Niemeyer, de l'Institut de Chimie Physiologique d'Utrecht, pour avoir mis l'ocillateur à notre disposition.

Mesure de l'activité photochimique. — L'activité photochimique était déterminée en tant qu'activité de la réaction de Hill, cf. par exemple French (1946) et Hill (1951). L'accepteur d'hydrogène était de la quinone distillée à la vapeur. L'oxygène libéré était dosé manométriquement. La température du thermostat était d'environ 13 °C.

Les fioles manométriques étaient illuminées avec la lumière d'une lampe à vapeur de sodium d'une intensité non saturante. Au cours d'expériences de contrôle, la relation entre l'évolution d'oxygène et l'intensité lumineuse fut déterminée. La saturation lumineuse se produisait à environ 2.10^4 ergs/cm²/sec. tandis que l'intensité utilisée dans nos expériences était de $7{,}31.10^3$ ergs/cm²/sec. L'absorption de la lumière dans la fiole de Warburg était d'environ 60 %.

Résultats.

La figure 1 montre la relation existant entre l'activité pour la photolyse de l'eau de suspensions préparées à partir d'Epinard (chloroplastes granulaires) et de *Fucus* (chloroplastes lamellaires) et le temps

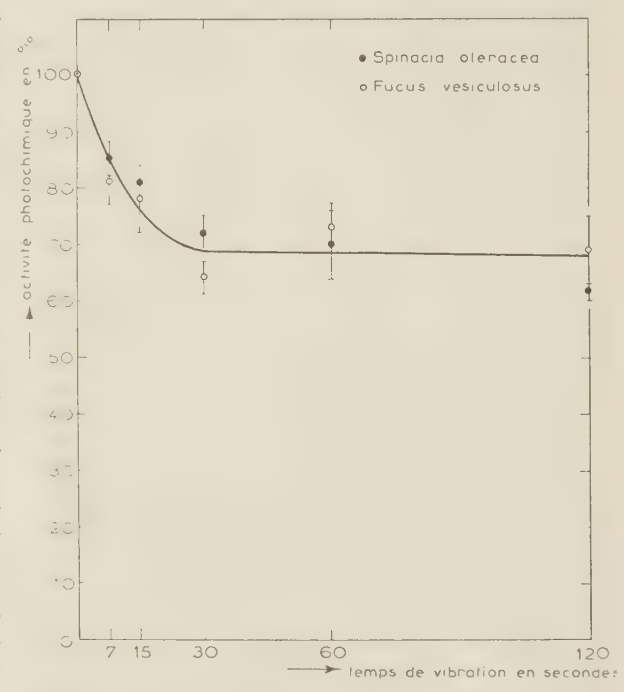


Fig. 1. — Relation entre l'activité de la réaction de Hill et la durée du traitement aux vibrations.

de désintégration. Comme nous l'avons déjà indiqué, nous n'avons étudié les effets que de périodes de vibration relativement courtes. L'activité photochimique des suspensions soumises aux vibrations est exprimée en pour cent de celle du témoin non soumis aux vibrations. Les points représentent des moyennes de cinq expériences, chaque expérience comprenant deux fioles de suspension témoin et trois fioles de suspension soumise aux vibrations. Lorsque le temps de vibration croît, l'activité décroît jusqu'à une valeur de 70 % pour une durée de désintégration de 30 secondes. La prolongation de cette durée jusqu'à deux minutes ne réduit sensiblement pas plus l'activité. Ceci vaut pour les deux objets.

La figure 2 montre à quel point les lamelles porteuses de pigment sont isolées les unes des autres. Les suspensions, préparées pour les deux objets, avaient été soumises à l'action des vibrations pendant 15 secondes. Puis elles avaient été centrifugées. Des sections ultra-fines du matériel sédimenté

furent pratiquées et étudiées sous le microscope électronique. La fixation, le sectionnement et la préparation des spécimens étudiés au microscope électronique ont été faits par Mr P. F. ELBERS,

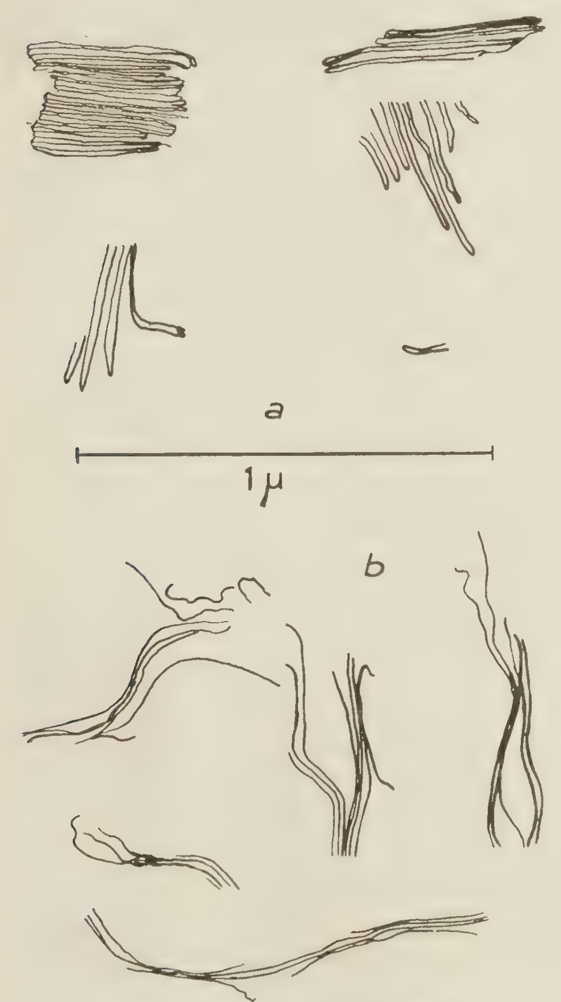


Fig. 2. — Dessins d'après des microphotographies électroniques de sections de suspensions d'Épinard (*a*) et de *Fucus* (*b*) soumises à l'action des vibrations pendant 15 secondes. On voit un certain nombre d'étapes de la désintégration. Les lamelles de grana d'Épinard sont séparées à l'état de couches doubles, tandis que les lamelles des chloroplastes lamellaires de *Fucus* sont séparées à l'état de couches isolées. Il a seulement été possible de représenter approximativement l'aspect véritable du granum intact d'Épinard (en haut, à gauche). Nos remerciements vont à Mr P. F. ELBERS qui a bien voulu préparer les sections et les microphotographies électroniques. Malheureusement, la reproduction de ces photographies n'est pas possible dans ce journal

du Centre de Microscopie Électronique d'Utrecht, à qui nous exprimons toute notre gratitude.

Il est visible que les lamelles des grana se séparent les unes des autres à l'état de doubles couches, tandis que les lamelles des chloroplastes lamellaires se séparent à l'état de couches isolées.

S'il était vrai que la diminution d'activité était due à une suppression des transferts d'énergie entre lamelles adjacentes, le traitement aux vibrations d'une suspension dans laquelle, d'une manière ou d'une autre, les lamelles seraient déjà séparées les unes des autres resterait sans effet. FREY-WYSSLING et STEINMANN (1953) ont montré que des lamelles de grana d'*Aspidistra* peuvent se gonfler en forme de sphère lorsqu'on les transfère dans un milieu hypotonique. De cette façon, l'aspect normal du granum en pile très compacte de lamelles fait place à un aspect en collier de perles, et les distances entre les surfaces lamellaires est augmentée à un tel degré que le transfert d'énergie n'est plus possible. A cet effet, des feuilles d'*Aspidistra* ont été broyées dans une solution tampon à laquelle avait été ajouté du saccharose à la concentration M/2. Puis le milieu avait été rendu hypotonique par dilution 2,5 fois avec du tampon sans saccharose. Une partie de ce mélange fut soumise aux vibrations pendant 30 secondes. La concentration élevée de saccharose dans la suspension initiale semblait réduire l'activité photochimique de façon non reproductible. Dans neuf expériences sur dix, cette activité par même quantité de chlorophylle était inférieure à celle de la « suspension hypotonique » : elle variait de 45 à 94 % de cette dernière. L'activité photochimique de la « suspension hypotonique » soumise aux vibrations était donc exprimée en pour cent de la suspension non traitée. Comme moyenne de 10 expériences, on a trouvé 119 ± 14 pour cent. Ceci signifie que l'activité des lamelles isolées par action osmotique n'est pas réduite davantage par action des vibrations pendant 30 secondes. Une fois de plus, ce résultat montre que le procédé de vibrations en tant que tel n'a pas d'effet destructeur sur le processus photochimique en question. Ceci est en accord avec la suggestion que la séparation des lamelles les unes des autres annihile le transfert d'énergie interlamellaire.

A cet égard, on peut rappeler que THOMAS, BLAAUW et DUYSENS (1953), cf. leur Tableau II, ont montré que le pourcentage d'activité de fragments lamellaires même fortement désintégrés de grana d'Épinard est considérablement plus élevé aux intensités lumineuses saturantes à la fois pour les suspensions soumises et non soumises aux vibrations qu'aux intensités non saturantes. Aux fortes intensités, cependant, l'activité des suspensions soumises aux vibrations décroît rapidement. Si les résultats des mêmes expériences sont extrapolées au temps zéro, l'activité des suspensions soumises aux vibrations à une intensité saturante de lumière incandescente de 2,07 10^5 ergs/cm²/sec se monte à respectivement 100, 84, 94, et 105 % de celle

des témoins. Puisque donc ces vitesses maximum ne sont pas beaucoup différentes de celle des témoins, ces résultats indiquent qu'il est très probable que les systèmes enzymatiques impliqués ne sont pas endommagés par le procédé de vibrations utilisé.

Discussion.

Dans les objets étudiés il a été trouvé que l'action des vibrations de 7 000 Hz en condition anaérobie n'affecte pas beaucoup les systèmes enzymatiques impliqués dans la photolyse de l'eau. Ceci veut dire que la diminution de cette activité photochimique enzymatiques actifs en question soit que leur activité individuelle sont réduits.

Par conséquent, les résultats suggèrent que cette diminution est due à la disparition d'une partie des molécules de pigment à partir desquelles, initialement, l'énergie d'excitation électronique pouvait être transférée et introduite dans les processus photochimiques en question par l'intermédiaire de tels centres enzymatiques.

Le fait que la réduction de l'activité que nous avons observée ne porte que sur la période initiale de vibrations indique qu'une partie des molécules pigment, qui « livrent » leur énergie d'excitation à un centre enzymatique, peuvent être ôtées de ce

Chloroplastes granulaires			Chloroplastes lamellaires		
cas	arrangement	Réduction d'activité en %	cas	arrangement	Réduction d'activité en %
G_1		n	L_1		n
G_2		05 n	L_2		n
G_3		0	L_3		0

Fig. 3. — Arrangements possibles des pigments photosynthétiques dans les chloroplastes granulaires et lamellaires étudiés et réduction de l'activité après un court traitement aux vibrations. On suppose qu'aucun transfert d'énergie ne se produit à travers les couches de protéines. Surfaces noires : pigments photosynthétiques. Surfaces en pointillé : lamelles. Les dessins ne sont pas à l'échelle.

après une courte période de vibrations ne peut s'expliquer en supposant soit que le nombre de centre centre plus facilement que les autres. Puisque l'examen au microscope électronique montre que la

première étape de la désintégration sous l'effet des vibrations consiste en une séparation des lamelles les unes des autres, il semble probable que les molécules de pigment « faciles » à ôter sont localisées à la surface d'une lamelle adjacente à celle dans laquelle le centre enzymatique en question est situé. Cette idée est en accord avec les résultats des expériences sur *Aspidistra*. En d'autres termes, ces résultats indiquent que, dans le chloroplaste, les transferts d'énergie se produisent en outre entre des molécules de pigment situées sur des lamelles adjacentes.

Pour deux raisons il est impossible d'obtenir un complément de confirmation à partir de calcul : les distances interlamellaires ne sont pas exactement connues, et la même observation vaut pour la situation et l'orientation des molécules de pigment. Sur les microphotographies électroniques de différentes espèces, on a trouvé que l'espacement interlamellaire était de 50 ± 20 Å, cf. LEYON (1956), et VON WETTSTEIN (1957). Comme d'après FÖRSTER (1957), le transfert d'énergie diminue avec la 6e puissance des distances intermoléculaires croissantes, il est évident que, même si l'on suppose que les intervalles ne sont pas modifiés par le procédé de fixation, la variation considérable des mesures de cette distance fait qu'il est inutile de discuter cette question quantitativement. On peut seulement ajouter que si les pigments sont localisés sur la partie la plus externe de la surface des lamelles la distance entre deux molécules de pigment opposées est plus petite que la distance indiquée ci-dessus. Les expériences de GOEDHEER (1957) donnent des renseignements sur cette localisation des pigments. Compte tenu de la conclusion de cet auteur que, probablement, les « têtes » porphyrine des molécules de chlorophylle sont préférentiellement, quoique faiblement, orientées dans le plan des lamelles, et considérant, cf. RABINOWITCH (1945), que l'épaisseur et le diamètre de ces plaques porphytrine sont respectivement de 4 et 15 Å, la distance entre deux plaques opposées pourrait être de 4 à 14 Å moindre que la distance entre les surfaces lamellaires.

D'après DUYSENS (1952), un transfert d'énergie entre molécules de chlorophylle *a* et *b* avec une efficacité de 96 % exige une distance intermoléculaire de 33 Å. Ceci a été calculé pour des centres de molécules arrangées cubiquement. En conséquence, il est évident que les valeurs précédentes ne vont pas à l'encontre de la conception en question d'un transfert d'énergie interlamellaire.

Si cette conception était exacte, elle pourrait servir à localiser les molécules de chlorophylle dans les lamelles de grana étudiés plus précisément qu'il n'était possible auparavant. Comme indiqué plus haut, les observations au microscope électronique ont montré que ces lamelles de grana demeurent à l'état de couche double après leur séparation sous l'effet des vibrations, tandis que les lamelles de chloroplastes lamellaires de *Fucus* se séparent à l'état de couches isolées. En supposant avec GOEDHEER (1957) que les pigments photosynthétiques sont concentrés en couches à la surface des lamelles, les dispositions illustrées par la figure 3 sont possibles.

Pour la discussion qui suit, nous allons faire les suppositions suivantes. En premier lieu, la distribution de la chlorophylle par unité de surface pigmentée, ainsi que celle des pigments accessoires, est la même dans les chloroplastes granulaires et lamellaires. Comme THOMAS, MINNAERT et ELBERS (1956) ont trouvé à la fois dans les chloroplastes granulaires et lamellaires que la surface moyenne de monocouche lamellaire disponible pour une molécule de chlorophylle est d'un ordre de grandeur constant, cette supposition paraît être raisonnable. En second lieu, l'efficacité du transfert d'énergie entre couches de pigment adjacentes est la même dans les deux types de chloroplastes. Puisque les rendements quantiques de photosynthèse, aux erreurs expérimentales près, sont les mêmes pour les deux types de chloroplastes — pour une revue de cette question, cf. RABINOWITCH (1951) —, la seconde supposition paraît être également plausible. Finalement, on suppose que les distances dans les doubles lamelles des grana ne sont pas modifiées par le traitement aux vibrations. Il paraît impossible d'obtenir confirmation de l'exactitude de cette supposition à partir de l'étude des microphotographies électroniques des sections. Si les couches sont sectionnées même légèrement à l'oblique, il en résulte des changements considérables dans l'épaisseur des couches blanches et noires. Tout ce qu'on peut dire c'est que le fait que les couches doubles restent parallèles même après la fragmentation des lamelles suggère que les distances intralamellaires ne sont pas modifiées. En partant de ces suppositions, nous pouvons présenter la discussion suivante, qui est donc d'un caractère hypothétique.

Soit n pour cent la réduction de l'activité photochimique provoquée par un court traitement aux vibrations dans le cas de l'annihilation totale du transfert d'énergie entre deux couches de pigment adjacentes. Pour abréger, nous appellerons ce transfert d'énergie « transfert vertical ».

Puisque dans les cas G_1, L_1 et L_2 toutes les couches de pigment adjacentes sont séparées les unes des autres si les lamelles sont isolées par le traitement aux vibrations, le transfert vertical va se trouver supprimé. On va donc mesurer une diminution de n pour cent de l'activité photochimique.

Dans le cas G_2, le transfert vertical entre couches de pigment adjacentes extérieures va être supprimé par le traitement aux vibrations, tandis que le transfert vertical entre les deux couches de pigment à

l'intérieur des deux lamelles n'en sera pas affecté : la réduction d'activité mesurée sera donc de 0,5 n % seulement.

Dans le cas G_3, la séparation ne déterminera aucune modification dans le transfert vertical, tandis que dans le cas L_3 aucun transfert vertical ne se produit et le transfert d'énergie ne sera donc pas affecté par ce procédé.

Les expériences présentes montrent que pour les chloroplastes granulaires d'Épinard ainsi que pour les chloroplastes lamellaires de *Fucus* un court traitement aux vibrations détermine une diminution d'activité photochimique d'environ 30 %. Ce résultat exclut la possibilité des cas G_3 et L_3. Puisqu'on a trouvé expérimentalement que le pourcentage de réduction d'activité était le même pour les deux types de chloroplastes, le cas G_2 paraît être improbable. Seul le cas G_1 est en accord avec le fait que le même pourcentage de réduction d'activité se produit pour les deux types de chloroplastes.

Jusqu'à ce point, on a tacitement supposé qu'il n'existait pas de transfert d'énergie à travers des couches de protéines. Si cela se produit, un raisonnement analogue montrerait que le cas G_1 est également le plus probable.

De cette discussion on peut tirer la conclusion que les expériences présentes semblent être en faveur de l'hypothèse que, dans les chloroplastes d'Épinard, les pigments photosynthétiques sont localisés à la surface externe des doubles lamelles constituant les grana.

Addendum.

Après avoir terminé la préparation de ce manuscrit, nous avons eu connaissance d'un article de A. T. Jagendorf et M. Evans, *Plant Physiol.* (1957), (**32**), 435. Ces auteurs ont soumis des suspensions provenant de feuilles de Haricot « red kidney » à des vibrations de 20 Kc pour différentes périodes de temps allant jusqu'à une demi-heure. Ils ont observé une diminution rapide de l'activité de la réaction de Hill, mesurée colorimétriquement par la réduction du 2,3,6-trichloro-indophénol, pendant les premières 90 secondes jusqu'à un niveau constant et bas. Ce niveau était le même pour des préparations initialement très actives ou peu actives. Ce phénomène est en vérité très intéressant. Cependant, afin d'éviter toute méprise, on doit remarquer que ces résultats ne sont pas comparables à ceux de Thomas, Blaauw et Duysens (1953) et, par conséquent, à ceux que nous venons de décrire. Jagendorf et Evans eux-mêmes ont énuméré un certain nombre de raisons pour lesquelles les résultats ne peuvent se comparer. A ces raisons, on peut en ajouter une autre. Les auteurs précédents — contrairement aux premiers — ont travaillé avec une intensité « considérablement au-dessus de la saturation ». Ceci signifie que la réduction observée était due à une inactivation des centres enzymatiques. Comme le traitement aux vibrations était conduit en condition aérobie, ce résultat est en accord avec l'observation de Thomas et coll. (1953) selon laquelle, en présence d'air, l'activité de la réaction de Hill de suspensions de chloroplastes d'Épinard diminue rapidement quand on les soumet à l'action des vibrations. Cependant, un désaccord subsiste concernant le degré de réduction. Jagendorf et Evans obtenaient une activité résiduelle faible, tandis que Thomas et coll. observaient une perte totale d'activité par traitement aux vibrations en condition aérobie. Il pourrait être intéressant d'étudier les raisons de ce désaccord.

Ces derniers auteurs, et aussi les auteurs du présent article, ont soumis les suspensions aux vibrations sous atmosphère d'azote pur et ont déterminé l'activité de la réaction de Hill pour des intensités non saturantes. Le fait que l'augmentation de l'intensité lumineuse au delà de la saturation produisait une augmentation d'activité même pour les suspensions ayant subi un long traitement jusqu'à une valeur à peu près égale à celle des témoins à cette intensité lumineuse élevée, indique que les systèmes enzymatiques n'étaient pas affectés par le traitement aux vibrations en conditions anéarobie. Ce qui signifie que Jagendorf et Evans et les auteurs de l'article présent ont observé et discuté des phénomènes tout à fait différents.

BIBLIOGRAPHIE

W. Arnold et J. R. Oppenheimer. — *J. Gen. Physiol.* 1950, **33**, 423.
Th. Butterfasz. — *Protoplasma*, 1957, **48**, 368.
R. Chardard. et C. Rouillier. — *Rev. Cytol. Biol. Végétales.*, 1957, **18**, 153.
R. K. Clayton — *Arch. Mikrobiol.* 1953, **19**, 107.
H. J. Dutton, W. M. Manning et B. M. Duggar. — *J. Phys. Chem.*, 1943, **47**, 308.
L. N. M. Duysens. — *Thesis*, Utrecht., 1952.
R. Emerson et C. M. Lewis. — *Am. J. Bot.*, 1941, **28**, 789.
R. Emerson et C. M. Lewis. — *J. Gen. Physiol.*, 1942, **25**, 579.
R. Emerson et C. M. Lewis. — *Am. J. Bot.*, 1943, **30**, 165.
Th. Förster. — *Fluoreszenz organischer Verbindungen.* Vandenhoeck and Ruprecht, Göttingen, 1951.
C. S. French. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1946, **15**, 397.
C. S. French et V. K. Young. — *J. Gen. Physiol.*, 1952, **35**, 873.
A. Frey-Wyssling et E. Steinmann. — *Vierteljahrsschr. Naturf. Ges. Zürich.*, 1953, **98**, 20.
J. C. Goedheer. — *Thesis*, Utrecht., 1957.
F. Haxo et L. R. Blinks. — *Am. J. Bot.*, 1946, **33**, 836.
F. Haxo et L. R. Blinks. — *J. Gen. Physiol.*, 1950, **33**, 389.
R. Hill. — *Adv. Enzymol.*, 1951, **12**, 1.
H. Leyon. — *Svensk Kemisk Tidskr.*, 1956, **68**, 70.

A. W. van NORMAN, C. S. FRENCH, et F. D. H. MACDOWALL. — *Plant Physiol.*, 1948, 23, 455.
E. I. RABINOWITCH. — *Photosynthesis and Related, Processes.* 1, II 1, II 2, *Interscience Publ. Inc.* New-York, 1945, 1951, 1956.
T. TANADA. — *Am. J. Bot.*, 1951, 38, 276.
J. B. THOMAS. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1950, 5, 186.
J. B. THOMAS. — *Progress Biophys. Biophys. Chem.*, 1955, 5, 109.
J. B. THOMAS, O. H. BLAAUW et L. N. M. DUYSENS. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1953, 10, 230.
J. B. THOMAS, L. C. POST et N. VERTREGT. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1954, 13, 20.
J. B. THOMAS, K. MINNAERT, et P. F. ELBERS. — *Acta, Bot., Neerl.*, 1956, 5, 315.
E. C. WASSINK et J. A. H. KERSTEN. — *Enzymologia.*, 1946, 12, 3.
D. VON WETTSTEIN. — *Exptl. Cell Res.*, 1957 12, 427.

TRANSFERTS D'ÉNERGIE ET SPECTRES DE FLUORESCENCE CHEZ PORPHYRIDIUM CRUENTUM

par S. STEVEN BRODY.

[*University of Illinois.*]

Traduit par J. LAVOREL.

I. Introduction.

Les spectres d'efficacité photosynthétique (*) de *Porphyridium cruentum* ([1]) indiquent que l'efficacité de la phycoérythrine est fonction de la longueur d'onde de la lumière avec laquelle les cellules ont été pré-illuminées. Si les cellules ont été cultivées en lumière bleue (436 mμ), l'efficacité de la phycoérythrine est faible comparée à celle de la chlorophylle. Si ces cellules sont exposées à une lumière verte intense (546 mμ) pendant environ une heure (le temps nécessaire semble être inversement proportionnel à l'intensité lumineuse), l'efficacité photosynthétique de la phycoérythrine augmente et devient ordinairement égale à celle de la chlorophylle.

On peut également observer l'effet inverse : lorsque les cellules ont été cultivées en lumière verte (546 mμ), l'efficacité de la phycoérythrine est élevée; lorsque ces cellules sont exposées à une lumière bleue intense (436 mμ), l'efficacité de la phycoérythrine diminue. Pour faciliter l'interprétation de ces résultats, nous avons étudié les spectres de fluorescence et les spectres d'efficacité de transfert (**) en fonction de pré-illumination avec des lumières de différentes longueurs d'onde. Les résultats sont en faveur de l'hypothèse suivant laquelle la lumière à 546 mμ augmente l'efficacité du transfert d'énergie de la phycoérythrine à la chlorophylle, tandis que l'illumination à 436 mμ la diminue. Ces expériences montrent que le couplage entre les différents pigments photosynthétiques d'un organisme donné est variable plutôt que constant (comme on pouvait le supposer d'après les mesures de photosynthèse de HAXO et BLINKS ([2]) et les mesures de fluorescence de DUYSENS ([3]) et de FRENCH et YOUNG ([4])). Que les variations de l'efficacité de transfert soit dues à des modifications intermoléculaires, plutôt qu'à des modifications intramoléculaires, est suggéré par des mesures menées à la température de l'azote liquide : les variations facilement produites par le traitement avec de la lumière verte ou bleue à la température ordinaire ne s'observent plus à basse température.

II. Méthodes et matériel.

Les variations du spectre de fluorescence et du spectre d'efficacité de transfert ont été étudiées en fonction des conditions de culture et de la lumière à laquelle les cellules avaient été adaptées. Le matériel biologique était l'algue rouge *Porphyridium cruentum*. Les cellules utilisées dans ces expériences étaient cultivées en lumière bleue (436 mμ) d'une intensité de 6,2 ou 0,5 × 10^4 ergs/cm^2 sec; ou en lumière verte (536 mμ) d'une intensité de 2,5 ou 0,2 × 10^4 ergs/cm^2 sec.

Il est démontré que la longueur d'onde et la vitesse d'absorption déterminent ensemble la concentration et la proportion des pigments (et probablement aussi l'« état » des pigments). Il est donc incorrect de vouloir caractériser les cultures par la couleur et l'intensité de la lumière à laquelle elles sont exposées. La vitesse de l'absorption lumineuse ne reste pas constante pendant la croissance; comme les cellules se multiplient, la densité de la culture et la concentration des pigments augmentent, il en résulte un effet d'ombrage mutuel accru. Les

(*) Le spectre d'efficacité photosynthétique est le quotient du spectre d'action de photosynthèse et du spectre d'absorption; on peut le mesurer directement en observant le spectre d'action dans des suspensions totalement absorbantes, où l'absorption est constante.

(**) Le spectre d'efficacité de transfert est une mesure de la possibilité d'exciter à l'aide d'énergie monochromatique de différentes longueurs d'onde la fluorescence de la chlorophylle.

densités de culture au moment de la récolte (7 jours après l'inoculation) n'étaient pas toujours les mêmes bien que les cultures aient été ensemencées avec des inocula de même valeur et conduites dans des conditions analogues, car la vitesse de croissance variait avec l'état des cellules utilisées pour l'inoculation. Ces variations de densité de culture deviennent extrêmement importantes lorsqu'on se souvient que la composition des pigments de chaque cellule est déterminée dans une grande partie par l'effet d'ombrage des cellules voisines.

Pour résoudre cette difficulté, le spectre de fluorescence et le spectre d'efficacité de transfert — déterminés avant « adaptation » — ont été utilisés pour caractériser une culture donnée.

Lorsque ces spectres étaient identiques pour deux cultures conduites selon un ensemble bien spécifié de conditions, nous avons supposé que les pigments se trouvaient dans un état semblable dans chacune d'entre elles.

Les expériences ont porté à la fois sur des densités de cultures élevées et faibles. Les cellules étaient en suspension dans du tampon carbonate n° 11.

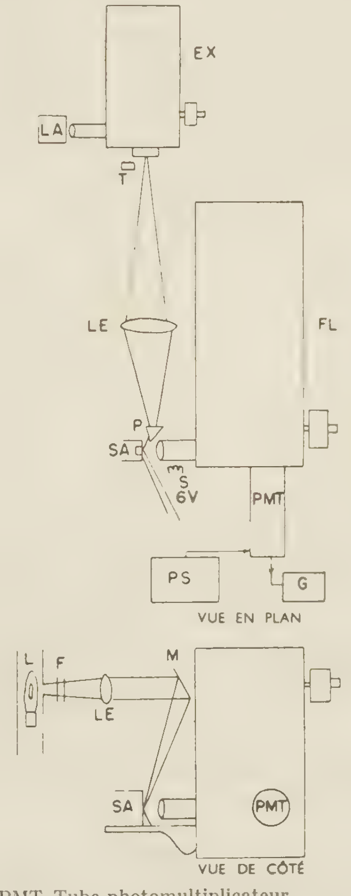
Description du montage.

Deux monochromateurs Bausch et Lomb ont été employés pour ces expériences (fig. 1). Celui qui servait à exciter la fluorescence avait une dispersion de 6,6 mμ par mm; la source de lumière utilisée à l'entrée de cet appareil était une lampe à ruban de tungstène de 6 volts. Afin d'obtenir des intensités de fluorescence convenables, la lampe était opérée à 10 volts. La distribution spectrale de l'énergie de la lumière excitatrice a été déterminée à l'aide d'un thermocouple Eppley placé immédiatement devant la fente de sortie. L'énergie incidente tombant sur les cellules était de 0,3 à $0{,}4 \times 10^4$ ergs/cm² sec, suivant la longueur d'onde.

Une image de la fente de sortie était formée à l'aide d'une lentille sur la face frontale de la cuvette contenant le matériel fluorescent; il est résultait une source de fluorescence de faible taille et de contour bien défini. L'incidence différait légèrement de la perpendiculaire de sorte que la lumière réfléchie n'entrait pas dans le second monochromateur, utilisé pour l'analyse de la fluorescence. Un tube photomultiplicateur RCA 6217 était placé derrière la fente de sortie de ce monochromateur, qui avait une dispersion de 3,3 mμ par mm.

Une source de tension stabilisée électroniquement alimentait le tube photomultiplicateur. Le courant du tube photomultiplicateur était mesuré à l'aide d'un galvanomètre Rubicon ayant une sensibilité de $2{,}2 \times 10^{-9}$ ampères/mm et une résistance de 4 680 ohms.

La lumière intense bleue ou verte, utilisée pour « adapter » les cellules, provenait d'une lampe à vapeur de mercure de 100 watts. Les raies spectrales désirées étaient isolées à l'aide de filtres Corning — la raie 436 mμ avec les filtres 5113, 3389; la raie 546 mμ avec les filtres 4303, 5120 et 3484. L'intensité de la lumière bleue tombant sur les cellules était de 3×10^4 ergs/cm² sec, et celle de la lumière verte de 2×10^4 ergs/cm² sec. L'intensité de la lumière « d'adaptation » était environ 5 fois plus grande que celle de la combinaison lampe + monochromateur utilisé pour exciter la fluorescence.



PMT Tube photomultiplicateur.
EX Monochromateur d'excitation.
FL Monochromateur de fluorescence.
SA Echantillon fluorescent.
LA Lampe à ruban de tungstène
LE Lentille.
PS Alimentation.
L Lampe à vapeur de mercure.
T Thermocouple.
S Lampe standard.
G Galvanomètre.
F Filtres.
M Miroir.
P Prisme.

La vue de côté du montage (fig. 1) montre la position de la lampe à vapeur de mercure par rapport à la suspension fluorescente. Une image de cette lampe était formée par un système optique dans le volume occupé par les cellules. La lumière réfléchie par la cuvette contenant l'échantillon n'était pas interceptée par le monochromateur de fluorescence.

Pour contrôler l'amplification du tube photomultiplicateur, on a utilisé comme lampe standard une petite lampe de 6 volts fonctionnant sur pile. Le monochromateur de fluorescence était réglé à une longueur d'onde et à une résolution données, et la réponse du tube photomultiplicateur était comparée à celle correspondant à la lampe standard. Ceci produisait un facteur de normalisation (pas supérieur à 1,2) qui permettait de rendre comparables entre elles des mesures faites d'un jour à l'autre. Tous les appareils électriques étaient branchés sur un transformateur régulateur de tension.

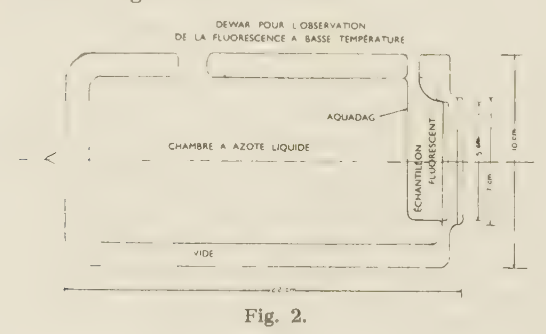


Fig. 2.

Le vase Dewar employé pour les expériences à basse température est représenté en coupe sur la figure 2. La suspension aqueuse de cellules était congelée en une mince couche sur la face interne de la chambre à échantillon. Afin d'éviter la réflexion de la lumière incidente par l'argenture du vase Dewar, l'intérieur de celui-ci avait été badigeonné d'aquadag.

Contrôle de la linéarité de la réponse de l'instrument et de la fluorescence des algues.

La linéarité de la réponse du fluoromètre a été vérifiée de la manière suivante. Les deux monochromateurs ont été réglés à 546 mμ. Une surface diffusante blanche a été placée dans la position de l'échantillon. On faisait varier l'intensité de la lumière en interposant des filtres neutres calibrés sur le trajet de la lumière. Les filtres neutres avaient été calibrés dans un spectrophotomètre Beckman DU pour des longueurs d'onde appropriées.

Le même procédé a été employé pour déterminer la linéarité de la fluorescence des algues; les cellules étaient excitées par la lumière à 546 mμ et la fluorescence de la chlorophylle était observée à 685 mμ.

Dans le domaine des intensités utilisées pour les expériences, nous avons trouvé que la fluorescence des cellules restait proportionnelle à l'intensité de la lumière excitatrice. (Les mesures étaient faites rapidement — avant que les cellules ne puissent s'adapter à la lumière excitatrice.) Franck et coll. ([5]) ont montré que le rendement quantique de fluorescenc chez *Hydrangea* ne variait pas sensiblement dans le domaine d'énergie utilisé dans cette étude (de 10^3 à 10^5 ergs/cm² sec). Ceci justifie la supposition que les effets d'adaptation n'étaient pas dus à une réponse non linéaire des cellules. La dépendance de la fluorescence des cellules à l'égard de l'intensité lumineuse est représentée sur la figure 3.

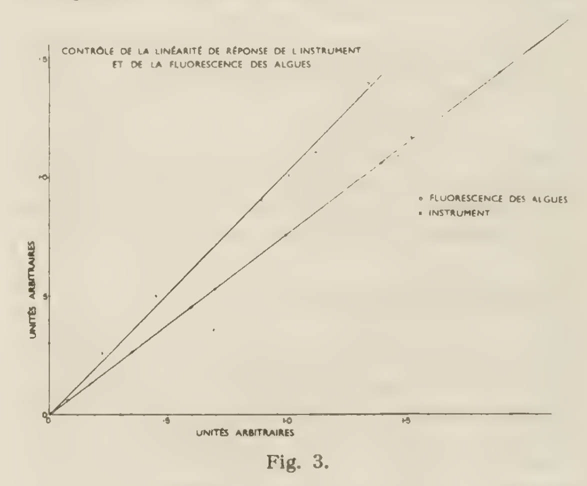


Fig. 3.

Afin de savoir si le sens de parcours des longueurs d'onde affectait le spectre d'efficacité de transfert de fluorescence, des expériences ont été faites en partant de l'extrêmité rouge ou bien de l'extrêmité bleue du spectre, ou encore en choisissant des longueurs d'onde au hasard. Les résultats obtenus furent toujours les mêmes, compte tenu des erreurs expérimentales. Nous avons constaté également que la concentration était sans effet sur les résultats.

Procédé de mesure des variations des spectres de fluorescence.

Les cellules étaient excitées dans une bande centrée à 546 mμ (d'une largeur de 10 mμ ou moins) provenant de la lumière d'une lampe à ruban de tungstène filtrée par le monochromateur d'excitation. La distribution énergétique du spectre de fluorescence entre 550 et 730 mμ fut relevée à l'aide du monochromateur de fluorescence (cf. fig. 1). Après avoir illuminé les cellules avec un faisceau intense de lumière bleue ou verte (que nous appelons lumière « adaptatrice ») pendant 15 ou 20 mn, le spectre de fluorescence

était de nouveau mesuré. La variation relative du rendement de fluorescence était obtenue en prenant le rapport des deux courbes d'intensité de fluorescence à chaque longueur d'onde. Certaines mesures de fluorescence étaient faites en présence, d'autres en absence de la lumière adatratrice. En présence de celle-ci, l'efficacité de l'excitation à 546 mμ provenant du monochromateur d'excitation était déterminée en soustrayant l'intensité de la fluorescence excitée par le faisceau excitateur seul de la fluorescence totale produite par les deux faisceaux ensemble.

La quantité qui seule nous intéressait était φ, l'intensité relative de fluorescence à une longueur d'onde donnée avant et après l'adaptation :

$$\varphi = \frac{\text{Fluorescence excitée à 546 m}\mu\text{ en présence de (ou après traitement avec) la lumière adaptatrice}}{\text{Fluorescence excitée à 546 m}\mu\text{ avant l'adaptation}}$$

Pour déterminer φ, il n'est pas nécessiare de corriger les mesures de fluorescence pour tenir compte de la réponse spectrale du photomultiplicateur ou de la réabsorption de la fluorescence, puisque la configuration géométrique du système demeure constante.

Sur la courbe $\varphi = f(\lambda)$, $\varphi = 1$ signifie que la lumière adaptatrice ne produit aucun effet; si $\varphi < 1$, cela signifie que la lumière adaptatrice a produit une diminution du rendement de fluorescence à cette longueur d'onde; si $\varphi > 1$, il y a eu au contraire augmentation du rendement de fluorescence. Nous avons choisi pour l'excitation la raie 546 mμ parce qu'elle se trouve dans le maximum d'absorption de la phycoérythrine et présente donc les meilleures conditions pour l'étude de l'effet de l'adaptation sur le transfert d'énergie de la phycoérythrine à la chlorophylle.

Les variations du spectre d'efficacité de transfert, induites par « l'adaptation », ont été mesurées en réglant le monochromateur de fluorescence à la longueur d'onde du maximum de fluorescence de la chlorophylle (685 mμ), et en excitant la fluorescence avec de la lumière monochromatique de longueur d'onde comprise entre 500 et 675 mμ. Les résultats obtenus pour l'efficacité relative de différents pigments pour l'excitation de la fluorescence de la chlorophylle avant et après l'adaptation ont été analysés de la même manière que décrit précédemment à propos du spectre de fluorescence.

III. Résultats.

Cellules cultivées en lumière bleue.

La figure 4 représente le spectre d'absorption de cellules de *Porphyridium* cultivées en lumière bleue dans les conditions décrites ci-dessus; le spectre d'efficacité pour l'excitation de la fluorescence de la chlorophylle à 685 mμ et le spectre de fluorescence (compte tenu de la réponse spectrale du photomultiplicateur) obtenu par excitation à 546 mμ et superposé au spectre d'absorption (Toutes les courbes sont en unités relatives).

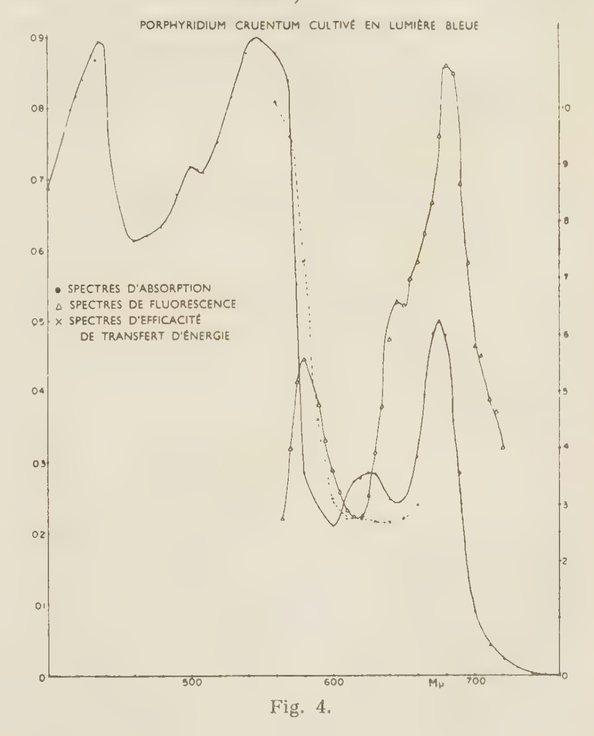


Fig. 4.

Après traitement des cellules avec la lumière adaptatrice bleue (436 mμ), on constate que la fluorescence des phycobilines n'a presque pas diminué, tandis que celle de la chlorophylle a beaucoup diminué. La figure 5 montre les variations du spectre de fluorescence excité à 546 mμ, telles qu'elles

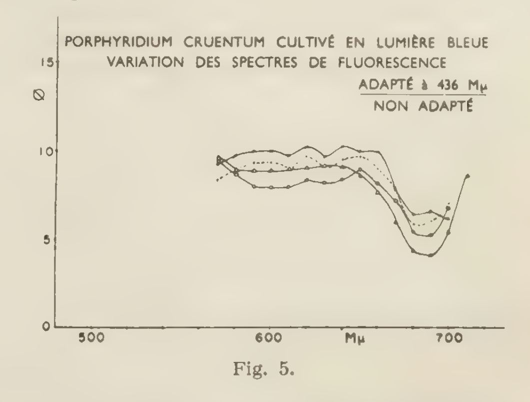


Fig. 5.

résultent d'un certain nombre d'expériences. Ces courbes indiquent que la lumière adaptatrice a diminué l'efficacité des phycobilines pour l'excitation de la fluorescence de la chlorophlle tandis que la lumière absorbée par la chlorophylle elle-même excite sa fluorescence avec à peu près la même efficacité qu'avant l'adaptation. La figure 6, qui représente la variation du spectre d'efficacité pour l'excitation de la fluorescence de la chlorophylle après l'adaptation, indique également que la pré-illumination à 436 mμ a rendu la phycoérythrine moins efficace.

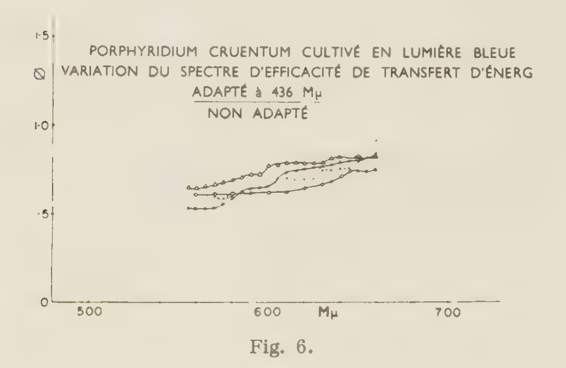


Fig. 6.

A mesure qu'on excite à des longueurs d'onde plus proches du maximum d'absorption de la chlorophylle, la diminution du rendement devient moins nette; l'efficacité de l'excitation se rapproche de la valeur qu'elle avait avant l'adaptation, et l'atteindrait probablement si les mesures pouvaient être poursuivies dans la région où la contribution des phycobilines à l'absorption totale de la cellule devient négligeable.

L'adaptation lumineuse à 546 mμ diminue la fluorescence de la phycoérythrine et augmente la fluorescence de la chlorophylle chez les cellules cultivées en lumière bleue (voir figure 7). L'efficacité

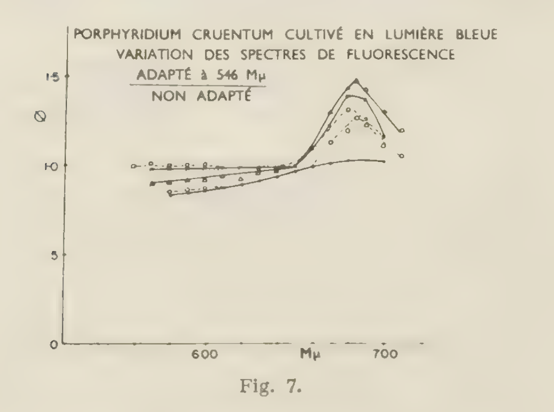


Fig. 7.

de transfert entre la phycoérythrine et la chlorophylle présente une augmentation générale après adaptation à la lumière verte (fig. 8). La chlorophylle elle-même semble être plus fluorescente qu'auparavant.

L'efficacité photosynthétique de la chlorophylle n'est pas modifiée par l'adaptation. Pareillement, l'efficacité de la lumière absorbée par la chlorophylle dans l'excitation de la fluorescence de la chlorophylle n'est pas modifiée par l'adaptation. Sur la figure 8, montrant l'adaptation à la lumière verte des cellules cultivées en lumière bleue, la légère augmentation de rendement aux longueurs d'onde les plus courtes peut s'expliquer par l'absorption de la lumière, faible mais significative, par les phycobilines jusqu'à 670 mμ.

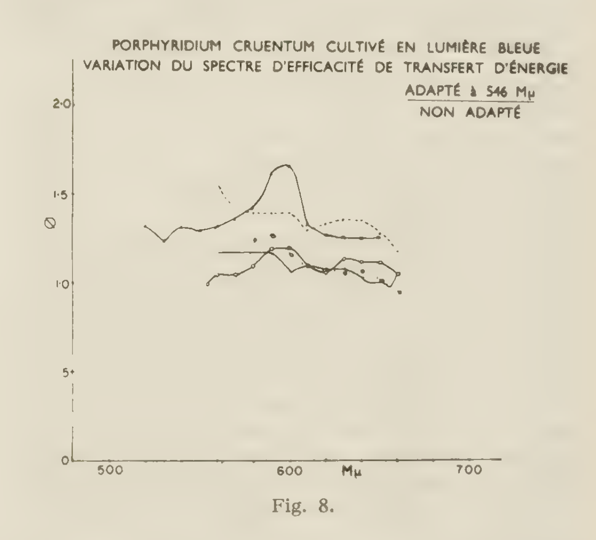


Fig. 8.

Dans un petit nombre d'expériences, la lumière adaptatrice à 436 mμ ne produisit pas son effet habituel, comme décrit plus haut, sur les spectres de fluorescence et d'efficacité de transfert. Ces « déviations » surviennent lorsque les cellules utilisées pour les mesures ont été cultivées en lumière bleue d'une intensité très forte, comparable à celle de la lumière adaptatrice.

Cellules cultivées en lumière verte.

Le spectre d'absorption, le spectre de fluorescence et le spectre d'efficacité de transfert de cellules cultivées en lumière verte sont représentés sur la figure 9. Le rapport de la chlorophylle à la phycoérythrine est considérablement plus élevé dans ces cellules que dans celles qui ont été cultivées en lumière bleue [1]. La fluorescence de la chlorophylle chez les premières est beaucoup plus faible que

chez les dernières. Ceci pourrait être dû à une autoabsorption plus importante chez les cellules cultivées en lumière verte par suite de leur teneur plus élevée en chlorophylle.

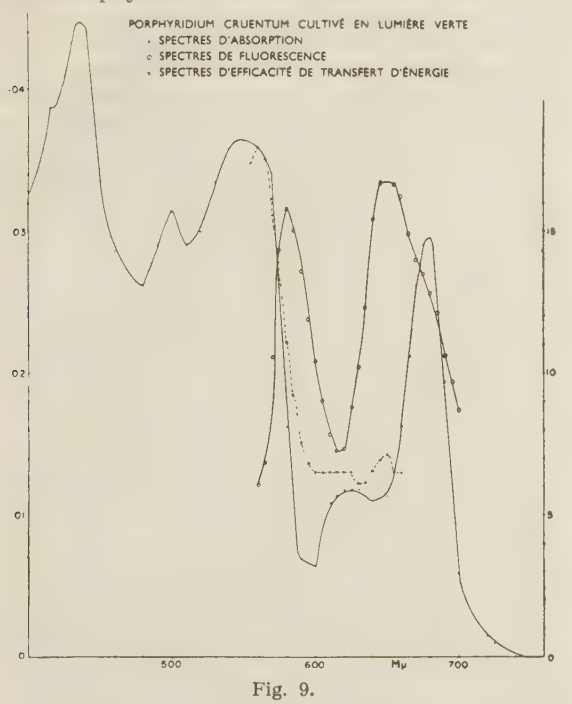


Fig. 9.

Si l'intensité de la lumière adaptatrice (546 mμ) est environ la même que l'intensité lumineuse

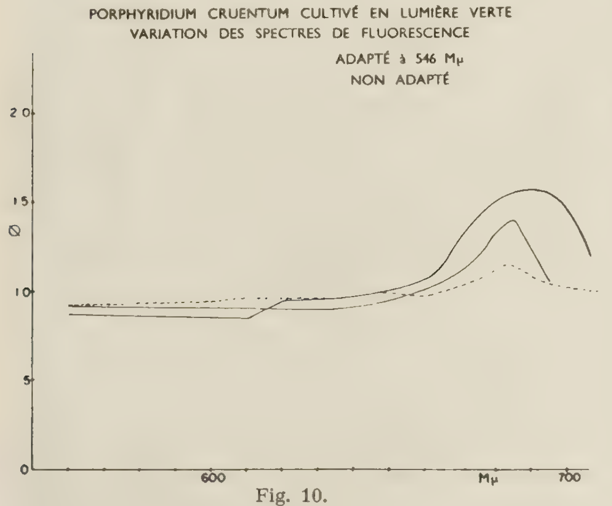


Fig. 10.

moyenne reçue par les cellules immédiatement avant la récolte, la lumière adaptatrice ne produit — comme on doit s'y attendre — aucune variation significative du spectre de fluorescence ou du spectre d'efficacité de transfert. Lorsque la lumière adaptatrice est plus forte que la lumière utilisée pendant la culture, certaines modifications se produisent; à savoir, une diminution de la fluorescence de la phycoérythrine et — quelquefois — une augmentation de la fluorescence de la chlorophylle. De telles variations des spectres de fluorescence peuvent se voir sur la figure 10.

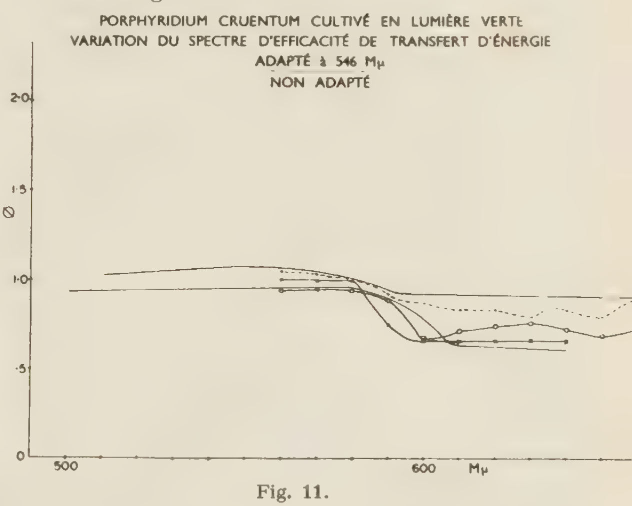


Fig. 11.

Les variations d'efficacité de transfert, provoquées chez les cellules cultivées en lumière verte par l'adaptation à 546 mμ, sont représentées sur la figure 11. On peut constater que l'absorption par la chlorophylle elle-même est devenue moins efficace

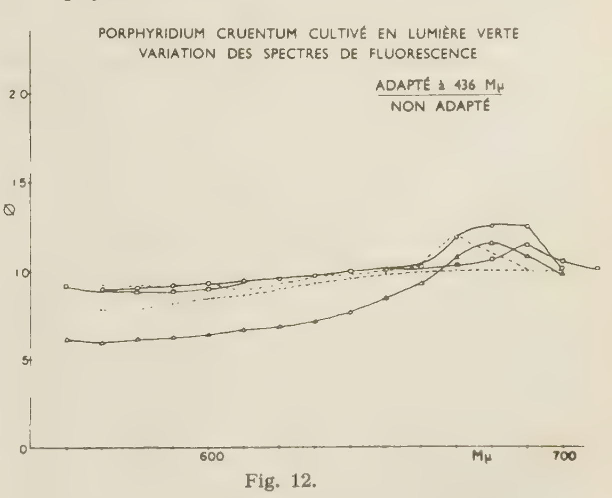


Fig. 12.

pour exciter la fluorescence de la chlorophylle qu'avant l'adaptation, tandis que l'efficacité de la phycoérythrine pour l'excitation de la fluorescence de la

chlorophylle a soit augmenté soit gardé la même valeur.

Après adaptation à la lumière bleue des cellules cultivées en lumière verte, le spectre d'efficacité de transfert présente d'ordinaire une fluorescence accrue de la chlorophylle pour presque toutes les longueurs d'onde d'excitation (fig. 13).

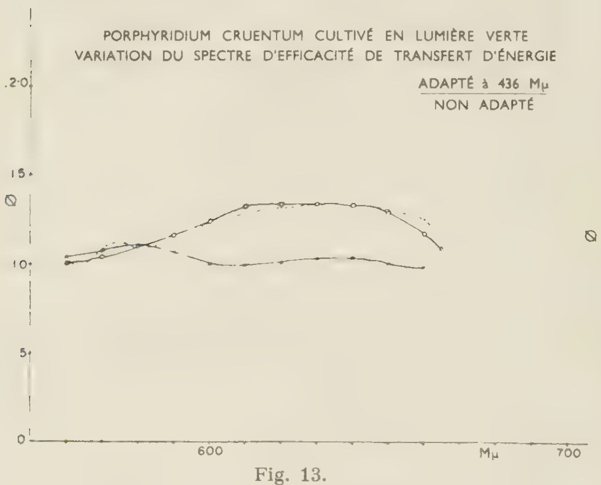


Fig. 13.

Les effets de la longueur d'onde de 436 mμ sur la photosynthèse et la fluorescence des cellules cultivées en lumière verte ne sont pas aussi marqués que ceux de la longueur d'onde de 546 mμ sur les cellules cultivées en lumière bleue. Ces derniers étaient très reproductibles, tandis que les premiers sont sujets à de plus grandes variations (qui auraient probablement pu être réduites en contrôlant plus étroitement les conditions de culture). Les modifications de la photosynthèse, de la fluorescence et du transfert d'énergie induites par l'adaptation à 644 mμ sont semblables à celles qui sont induites par l'adaptation à 436 mμ.

Origine physique ou chimique des effets d'adaptation.

Les effets d'adaptation peuvent résulter de réarrangements intra- ou inter moléculaires. Les premiers ne nécessitent aucune énergie d'activation et seront considérés ici comme modifications « physiques », tandis que les seconds qui nécessitent une énergie d'activation seront considérés comme modifications « chimiques ». Les modifications « physiques » (telles que l'état triplet doublement excité suggéré par Franck) ([7]) peuvent être facilement distinguées des modifications « chimiques » qui, en raison du fait qu'elles nécessitent une énergie d'activation, peuvent même comprendre des phénomènes tels que la diffusion). Les considérations qui suivent peuvent servir à déterminer lequel des deux processus suggéré se produit réellement pendant l'adaptation. Si l'adaptation est d'une nature « chimique », elle devrait persister après cessation de l'illumination; si elle est de nature « physique », elle ne devrait être présente qu'aussi longtemps que les cellules sont illuminées et devrait disparaître immédiatement après cessation de l'illumination.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, nos expériences montrent que l'adaptation persiste en effet à l'obscurité. Les mesures de photosynthèse montrent également que, une fois que les cellules ont été conditionnées à une certaine couleur de lumière, leur spectre d'efficacité demeure inchangé (pendant plusieurs heures à l'obscurité ou jusqu'à exposition à une lumière différente). Ces expériences sont en faveur de l'hypothèse que les effets d'adaptation sont provoqués par des modifications « chimiques ».

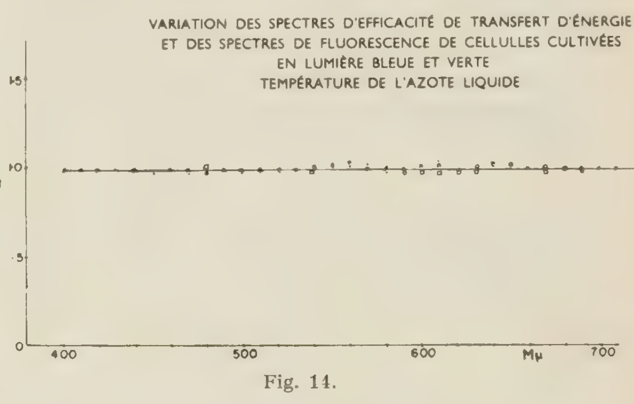


Fig. 14.

Nous avons encore entrepris une autre expérience consistant à refroidir les cellules à la température de l'azote liquide. Dans cet état, aucun processus chimique ne peut se produire, mais les propriétés physiques des molécules restent essentiellement inchangées. A — 195 °C, la lumière adaptatrice ne produit aucune modification du spectre de fluorescence ou du spectre de transfert, comme on le voit sur la figure 14. (Bien entendu, la basse température elle-même modifiait le spectre de fluorescence, ainsi que le spectre de transfert; mais l'adaptation restait sans effet). Ce résultat, également, s'accorde avec l'hypothèse que des variations de l'arrangement des molécules des différents pigments entre eux expliquent les effets d'adaptation.

Aucune différence significative ne put être décelée entre les spectres d'absorption des algues adaptées et non adaptées; ces mesures d'absorption ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman modèle DU. Il est possible que l'adaptation consiste en un réarrangement d'un très petit nombre de molécules (mais dont la localisation est critique), dont le déplacement ne pourrait être détecté par une

méthode de mesure de l'absorption aussi grossière que celle que nous avons utilisée dans le présent travail.

IV. Discussion.

Pour commencer, nous devons faire remarquer que l'augmentation de rendement de fluorescence avec l'intensité lumineuse, telle que l'ont observée LATIMER (6) et FRANCK et coll. (5), ne peut expliquer les observations décrites dans cet article. Leurs résultats montrent que le rendement de la fluorescence de la chlorophylle augmente en même temps que l'intensité lumineuse, sauf dans la région comprise entre 10^3 à 10^5 ergs/cm² sec où le rendement de fluorescence est constant. Nos mesures du phénomène d'adaptation, toutes opérées dans cette région, montrent que le rendement de la fluorescence de la chlorophylle peut augmenter aussi bien que décroître, selon la façon dont les cellules ont été cultivées et selon la couleur de la lumière adaptatrice.

FRENCH et YOUNG ont observé une diminution de la fluorescence de la chlorophylle et de la phycocyanine pour des cellules exposées à de fortes intensités lumineuses. Les résultats que nous avons présentés ci-dessus pour des cellules cultivées en lumière bleue — exposées à une forte lumière bleue — sont analogues à ceux de FRENCH et YOUNG. Par contre, ils n'ont constaté aucune variation du rendement de fluorescence de la phycoérythrine, à l'opposé des résultats du présent travail.

Les modifications que nous avons observées dans les spectres de fluorescence et de transfert d'énergie chez des cellules cultivées en lumière verte ne peuvent s'expliquer seulement par des modifications de couplage entre les pigments — explication qui est satisfaisante pour les cellules cultivées en lumière bleue. « L'adaptation » des cellules cultivées en lumière verte à 436 mμ diminue, selon M. BRODY, l'efficacité de la photosynthèse sensibilisée par la phycoérythrine; les spectres de fluorescence (fig. 12) montrent cependant que, après ce genre d'adaptation, la fluorescence de la phycoérythrine devient *plus faible* et celle de la chlorophylle *plus forte*. Autrement dit, le parallélisme entre la photosynthèse et la fluorescence de la chlorophylle, observé dans l'adaptation des cellules cultivées en lumière bleue, fait place à un anti-parallélisme chez les cellules cultivées en lumière verte.

Il est possible de rendre compte de cet anti-parallélisme en supposant que la chlorophylle et la phycoérythrine peuvent se présenter sous deux formes *in vivo* (une forme monomère et une forme aggrégée). Il existe — au moins pour la chlorophylle — des observations en faveur de cette hypothèse) (8). On peut de plus supposer que la forme monomère est fluorescente, quoique inactive au point de vue de la photosynthèse. Des variations de fluorescence et de transfert d'énergie pourraient alors résulter de modifications dans le couplage entre les différents pigments, ou dans la proportion entre les deux formes des pigments, ou des deux à la fois. Ce schéma suppose implicitement que la chlorophylle est le sensibilisateur photochimique primaire.

Quand les intensités de la lumière excitatrice sont de l'ordre de 10 ergs/cm², ou plus fortes, le rendement quantique de la photosynthèse diminue et celui de la fluorescence augmente. Cet effet peut être interprété en supposant que pour des intensités aussi fortes la population des molécules de chlorophylle monomères commence à augmenter aux dépens de la forme agrégée — les premières donnant une augmentation de fluorescence, la diminution de la seconde provoquant une diminution de la photosynthèse.

Les cellules cultivées en lumière verte ont un rapport chlorophylle/phycobiline élevé et présentent une fluorescence de la chlorophylle relativement faible. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de l'auto-absorption de la fluorescence de la chlorophylle, ou par une augmentation de la population des molécules de chlorophylle agrégée, non fluorescente.

Les cellules cultivées en lumière bleue ont un rapport chlorophylle/phycobiline bas, et présentent une fluorescence plus intense que les cellules cultivées en lumière verte. Ceci peut s'expliquer par une diminution de l'auto-absorption de la fluorescence de la chlorophylle, ou par une diminution de sa forme monomère, fluorescente.

Adaptation à la lumière bleue intense (436 mμ) *des cellules cultivées en lumière bleue.*

L'efficacité de la chlorophylle pour sensibiliser la photosynthèse n'est pas modifiée par adaptation à une lumière intense à 436 mμ, mais ce traitement semble découpler la chlorophylle des phycobilines. On pourrait être tenté de croire que le rendement de fluorescence de la chlorophylle a diminué (fig. 5), mais la forme des spectres d'efficacité de transfert (fig. 6) exclut cette possibilité. Ces spectres montrent que, après l'adaptation, l'excitation des phycobilines détermine une moindre fluorescence que l'excitation de la chlorophylle elle-même. Puisque l'énergie est absorbée en premier lieu par la chlorophylle, les modifications observées doivent être amorcées par la chlorophylle elle-même. Il est possible que l'énergie additionnelle qui doit être transformée provoque des modifications dans l'organisation des molécules de chlorophylle et qu'il en résulte un couplage plus faible entre la chlorophylle et les phycobilines. Cette diminution de l'efficacité des phycobilines pour transférer l'énergie à la chlorophylle se manifeste également dans une plus faible efficacité photosynthétique des phycobilines (comme l'avait antérieurement montré M. BRODY).

Adaptation à la lumière verte (546 mμ) *des cellules cultivées en lumière bleue.*

L'adaptation à une lumière intense à 546 mμ détermine une augmentation de l'efficacité de transfert de l'énergie de la phycoérythrine à la chlorophylle, qui se traduit par une augmentation de la fluorescence de la chlrophylle et une diminution de celle de la phycoérythrine lorsque les cellules sont excitées par une lumière verte faible (546 mμ). Après adaptation, le processus de transfert d'énergie exerce une compétition plus efficace avec la fluorescence de la phycoérythrine pour l'utilisation de l'énergie absorbée.

L'augmentation du rendement de fluorescence de la chlorophylle sensibilisée par la phycoérythrine et l'augmentation du rendement de photosynthèse sensibilisée par la phycoérythrine (*) sont dans un très bon accord quantitatif. L'amélioration du couplage de la phycoérythrine avec la chlorophylle peut s'expliquer en supposant que la phycoérythrine est en état de « narcose sombre » avant adaptation à la lumière verte. L'adaptation supprime la narcose, et rend ainsi la phycoérythrine plus active au point de vue de la photosynthèse (peut-être en augmentant son agrégation avec elle-même ou avec la chlorophylle); en même temps, son rendement de fluorescence diminue.

Adaptation à la lumière verte intense (546 mμ) *des cellules cultivées en lumière verte.*

M. Brody n'avait pas fait de mesures de photosynthèse sur des cellules cultivées en lumière verte et adaptées à une lumière verte encore plus intense. Cependant, ses mesures de l'efficacité photosynthétique de la phycoérythrine comparée à celle de la chlorophylle, chez des cellules cultivées en lumière verte, ont montré que, dans certaines conditions, la chlorophylle et la phycoérythrine ont une efficacité égale; avec de telles cellules, on ne peut s'attendre à aucun effet de l'adaptation à 546 mμ, puisque la phycoérythrine opère déjà avec son efficacité maximum. Si, avant l'adaptation, la phycoérythrine avait été moins efficace que la chlorophylle pour la photosynthèse, alors (en analogie avec le cas des cellules cultivées en lumière bleue) on devrait s'attendre à ce que une lumière intense à 546 mμ augmente son efficacité — jusqu'au niveau de la chlorophylle.

Une explication de l'effet de l'adaptation à 546 mμ des cellules cultivées en lumière verte (c'est-à-dire la diminution de la fluorescence de la phycoérythrine et de l'efficacité de la chrorophylle pour exciter la fluorescence de la chlorophylle) est que l'efficacité de transfert de la phycoérythrine à la chlorophylle a augmenté et que la population des monomères fluorescents de la chlorophylle a diminué. L'efficacité de la phycoérythrine pour exciter la fluorescence de la chlorophylle ne varie pas (ou même augmente, dans certaines expériences); ceci se produit si, après l'adaptation, la phycoérythrine s'associe avec une plus grande population de molécules de chlorophylle. La notion de coexistence dans la cellule de deux types d'unités, c'est-à-dire phycoérythrine — chlorophylle et chlorphylle seule, a été pour la première fois introduite par Duysens [3].

Adaptation à la lumière bleue (436 mμ) *des cellules cultivées en lumière verte.*

Lorsque des cellules cultivées en lumière verte sont adaptées à 436 mμ, l'efficacité photosynthétique de la phycoérythrine diminue (*), et le spectre de fluorescence commence à ressembler à celui des cellules cultivées en lumière bleue (il y a augmentation de la fluorescence de la chlorophylle). Les cellules cultivées en lumière verte ont une forte teneur en chlorophylle comparée à celle de la phycoérythrine, de sorte que, lorsque les cellules sont exposées à une lumière d'une longueur d'onde de 436 mμ, elles pourraient absorber l'énergie à une vitesse excédant la capacité d'utilisation de cette énergie par la cellule. Pour empêcher la photoxydation, les pertes d'énergie augmentent — par exemple, par augmentation de la forme monomère de la chlorophylle. Le spectre d'efficacité de transfert de l'énergie présente une augmentation de la fluorescence de la chlorophylle (résultant d'une augmentation de la forme monomère de la chlorophylle), et le spectre de fluorescence montre que la phycoérythrine est moins fluorescente et transfère davantage de son énergie à la chlorophylle fluorescente (tandis qu'il y en a moins de disponible pour la photosynthèse). Une augmentation de la forme monomère de la chlorophylle devrait provoquer une légère diminution de son efficacité photosyn thétique (bien que de telles variations n'aient pas été mentionnées, une diminution de la photosynthèse de moins de 10 % pourrait avoir échappé à nos moyens de détection).

BIBLIOGRAPHIE

(1) M. Brody. — Thèse, Univ. of Illinois, 1958.
(2) F. T. Haxo et L. R. Blincks. — *J. Gen. Physiol.*, 1950, 33, 389.
(3) L. Duysens. — Thèse, Univ. of Utrecht, 1952.
(4) C. S. French et V. K. Young. — *J. Gen. Physiol.*, 1952, 35, 387.
(5) J. Franck, C. S. French et T. T. Puck. — *Journ. Phys. Chem.*, 1941, 45, 1268.
(6) P. Latimer. — Thèse, Univ. of Illinois, 1956.
(7) J. Franck. — *Dudalus*, 1955, 86, 17.

(8) A. A. Krasnovsky et al., — *Compt. rend. Acad. Sci. URSS*, 1953, **92**, 1202.

DISCUSSION

H. P. Kallmann. — Je voudrais savoir comment vous avez mesuré ces petites différences de constante de temps.

S. Brody. — Pour faire des mesures de durée de vie, j'ai utilisé une lampe spéciale ayant une durée d'éclair de 10^{-9} sec environ pour provoquer la fluorescence. La fluorescence était détectée et le signal amplifié par un tube photomultiplicateur; le signal était étalé sur un tube à rayons cathodiques. Pour obtenir une amplification suffisante du signal, le tube photomultiplicateur était poussé jusqu'à 4 000 volts pendant plusieurs microsecondes. Aucun amplificateur n'était utilisé.

REMARQUES SUR LE TRANSFERT D'ÉNERGIE DANS LA CHAINE PHOTOSYNTHÉTIQUE :

Quelques notes sur l'absorption de l'énergie lumineuse, le transfert d'énergie, les réactions subséquentes et les phénomènes qui accompagnent la photosynthèse.

par E. C. WASSINK.

[*Laboratoire de Recherche Physiologique sur les Plantes, Université d'Agriculture, Wageningen, Pays-Bas*(*)]

Traduit de l'anglais par Mme J. CYROT

SOMMAIRE

On doit distinguer différents types de transfert d'énergie faisant suite à l'absorption d'énergie lumineuse, dans le processus de la photosynthèse, savoir : entre des molécules de pigment de même espèce, entre des pigments différents, des pigments à leurs supports de protéine, aux molécules d'accepteur et plus loin dans la chaîne chimique aux produits finaux de la photosynthèse. C'est de ces points de vue que nous discuterons les études effectuées dans ce laboratoire, en tenant également compte des résultats obtenus ailleurs. On peut faire état des résultats suivants.

L'énergie lumineuse est transférée par l'intermédiaire du pigment, ce qui implique un transfert entre les molécules de chlorophylle, et un transfert des pigments auxiliaires à la chlorophylle ; elle est probablement finalement captée dans un pigment chlorophyllien, dans la photosynthèse non bactérienne caractérisée par une diminution d'absorption aux environs de 705 mμ.

Les observations faites sur le système de pigment des organismes photosynthétiques tendent à confirmer l'existence de liaisons distinctes pigment-protéine ; une même espèce de pigment peut former différents types de complexes pigment-protéine. Récemment l'attention a été attirée sur la possibilité de propriétés semi-conductrices dans les chloroplastes ; et l'on considère la possibilité d'un transport d'électron par l'intermédiaire du pigment et des couches de protéine comme probable.

Nous discuterons dans cet article les relations qui existent entre les résultats des études cinétiques de la fluorescence de la chlorophylle, les observations faites sur les potentiels d'oxydo-réduction en relation avec la photosynthèse, les modifications du spectre d'absorption et la luminescence retardée des chloroplastes. Il existe des rapports étroits entre ces phénomènes, ce qui est en accord avec l'idée que le transfert d'énergie lumineuse donne naissance à des déplacements oxydoréducteurs qui, en principe, sont réversibles.

Les modifications les plus régulières du spectre d'absorption par irradiation dans différents types d'organismes font ressortir le rôle important joué par les cytochromes dans le transfert d'énergie subséquent. Il y a probablement aussi participation des nucléotides de pyridine.

Des études sur la phosphorylation photosynthétique à long et court terme dans des cellules intactes en présence et en l'absence de CO_2 et la comparaison de la saturation lumineuse des différents phénomènes qui se produisent en même temps que la photosynthèse suggèrent que la formation de liaisons phosphate riches en énergie est essentielle pour le transfert d'énergie dans la chaîne photosynthétique et que leur formation est au début indépendante de CO_2.

L'influence de CO_2 sur les divers phénomènes ne débute qu'environ 20 *s* après le début de l'irradiation, ce qui suggère que dans cette période des réservoirs de produits intermédiaires présents dans l'obscurité permettent le départ de la chaîne photosynthétique. Leur réadaptation à la lumière et leur remplissage par le CO_2 produisent les différents « effets initiaux ». Des modifications considérables de la taille de ces réservoirs semblent dans de nombreux cas limitées seulement à une région de faibles intensités lumineuses.

Après achèvement de la photosynthèse, il se produit dans les plantes un autre transfert d'énergie, comportant l'assimilation d'azote et des processus formatifs. Nous faisons brièvement allusion ici à la réduction directe de l'azote par la lumière et à la relation qui existe entre les processus d'énergie lumineuse et d'excitation lumineuse.

1. — Introduction.

Le terme « photosynthèse » a trait à la réduction du gaz carbonique en substances organiques, surtout en hydrates de carbone, par les plantes vertes. Ce processus est en outre caractérisé par l'oxydation de l'eau, produisant une évolution d'oxygène. Ce phénomène ne se produit qu'avec l'absorption d'une quantité convenable d'énergie lumineuse, ainsi que l'exige le bilan énergétique. En fait, il faut même qu'il y ait absorption de quantités plus grandes d'énergie, puisque le rendement du processus est inférieur à l'unité. Si l'on considère les hydrates de carbone comme les premiers produits de la photosynthèse, on estime généralement à environ 112 kcal l'énergie nécessaire à la réduction d'une molécule de CO_2 en une unité élémentaire « CH_2O ».

Des preuves provenant de la photochimie générale,

(*) 178e Communication, 62 Comm. sur la Photosynthèse.

et également des résultats obtenus dans le domaine de la photosynthèse elle-même ont depuis longtemps indiqué que l'énergie lumineuse agit en photosynthèse sous forme de quanta de lumière [1]. La lumière est absorbée par un complexe de pigment dont les principaux constituants sont le plus souvent une ou plusieurs chlorophylles, auxquelles s'ajoutent dans certains cas des caroténoïdes spécifiques ou des phycobilines. Dans les dernières années, il y a eu de plus en plus de preuves que la chlorophylle *a* dans une très grande partie du règne végétal est le seul pigment en relation avec l'aspect « chimique » de la photosynthèse, alors que d'autres pigments contribuent à la fourniture d'énergie pour la photosynthèse uniquement par transfert de l'énergie absorbée à la chlorophylle *a*, soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres pigments.

En dehors de la photosynthèse « classique », telle que nous en avons brièvement parlé ci-dessus, on trouve une variante très intéressante dans les bactéries pourpres sulfureuses et non sulfureuses et les bactéries vertes sulfureuses. Elles sont caractérisées par la possession d'un système de pigment semblable mais non identique à celui des autres plantes. Elles manquent de chlorophylles ordinaires, qui sont représentées dans ces bactéries par des types voisins : un pigment, ayant des rapports très étroits avec la chlorophylle *a* dans les bactéries vertes sulfureuses (acétyl-chlorophylle *a*) et la bactériochlorophylle dans les bactéries pourpres. Cette dernière est une forme réduite de l'acétyl-chlorophylle *a*, ayant deux atomes d'hydrogène supplémentaires dans l'un de ses noyaux pyrrol [2]. Ces deux groupes de bactéries sont surtout limités aux conditions anaérobiques ou presque anaérobiques. Ces bactéries sont capables d'élaborer un processus tout à fait comparable à la photosynthèse par le fait qu'elles sont capables de réduire le gaz carbonique en même temps qu'elles prennent de l'énergie rayonnante [3]. Mais elles ne produisent pas d'oxygène. Ceci va de pair avec leurs besoins en substances réduites pour produire la réduction photosynthétique du gaz carbonique, c'est-à-dire, de composés soufrés réduits dans les bactéries vertes sulfureuses et dans les bactéries pourpres sulfureuses (Thiorhodaceae), et une variété de composés organiques réduits dans les Athiorhodaceae (bactéries pourpres non sulfureuses). Le métabolisme de ces dernières est particulièrement remarquable en ce qu'elles peuvent remplacer la lumière par de l'oxygène, l'énergie d'oxydation étant ainsi utilisée pour la réduction du gaz carbonique ou pour un métabolisme complètement hétérotrophe. Chez certaines bactéries pourpres sulfureuses, l'hydrogène gazeux peut jouer le rôle de « composé réduit ». Le phénomène particulièrement intéressant ici est que l'ensemble de l'équation $CO_2 + 2H_2 \rightarrow CH_2O + H_2O$ ne représente qu'un très faible déplacement de l'énergie totale. La quantité d'énergie lumineuse exigée pour le déroulement continu de ce processus par les cellules vivantes est cependant (par mol. de CO_2) du même ordre de grandeur que celle exigée pour la photosynthèse des plantes vertes, réalisant la conversion $CO_2 + 2H_2O \rightarrow CH_2O + H_2O + O_2$ qui comprend une élévation d'énergie considérablement plus forte. L'explication évidente est que tout type de photosynthèse, indépendante de la conversion d'énergie totale, comprend certains stades exigeant une forte énergie, soit sous forme d'énergie d'activation, soit sous forme d'énergie chimique, emmagasinée temporairement ou jusqu'aux produits finaux. On a souvent suggéré que ces stades sont les mêmes dans tous les cas et qu'ils peuvent être condensés en : $H_2O \rightarrow H + OH$. Sous cette forme grossière, cette théorie est probablement incorrecte mais des stades exigeant de l'énergie d'une nature comparable — notamment la libération photochimique d'hydrogène à partir d'une molécule complexe d'un certain type — sont communs à tous les types de photosynthèse. L'auteur du présent article soutient le point de vue qu'il n'y a pas de preuves de leur absolue identité dans les différents types de photosynthèse [4].

Les types bactériens de photosynthèse qui ne libèrent pas d'oxygène, sont en général appelés « photoréduction ». La non-libération d'oxygène est liée à l'interaction obligatoire des substances réductrices mentionnées ci-dessus, celles-ci s'oxydant au fur et à mesure que se fait la réduction du gaz carbonique, produisant ainsi de l'énergie en retour à l'équation d'équilibre. Cela pourrait suggérer un rôle très secondaire de ces substances dans le mécanisme de photosynthèse bactérienne. Certaines observations, que nous discuterons par la suite, font cependant ressortir un rôle plus important de ces substances.

Une caractéristique évidemment importante du système pigmentaire d'un organisme photosynthétique est son spectre d'absorption. Ce spectre est caractérisé par celui de la chlorophylle et celui des pigments « auxiliaires » : caroténoïdes (comprenant les xanthophylles), phycobilines et autres chlorophylles. On connaît plusieurs formes de chlorophylle qui se distinguent chimiquement par des différences dans les chaînes latérales, ce qui a de l'influence sur leur spectre d'absorption. Les chlorophylles ont un fort maximum d'absorption dans le bleu et un maximum parfois nettement plus faible dans le rouge. Ce dernier est important car son excitation est étroitement liée à l'émission de fluorescence. L'étude de la fluorescence a donné de nombreux renseignements sur le transfert d'énergie. En outre, on suppose généralement que le maximum de longueur d'onde de la bande de fluorescence est une

indication de la grandeur des quanta d'énergie dont peut disposer le circuit chimique de la photosynthèse. A cet égard il semble important que cette longueur d'onde maximum du spectre de fluorescence se trouve être beaucoup plus grande (ce qui correspond donc à des quanta plus faibles) dans les bactéries pourpres. Cela pourrait faire penser à des différences de nature chimique de l'accepteur ou des accepteurs d'énergie primaire. L'absorption correspondante pour les bactéries pourpres se trouve dans le proche infra-rouge; nous en parlerons en détails ci-dessous. Certains organismes contiennent des caroténoïdes participant au phénomène de photosynthèse, qui absorbent principalement dans la région verte du spectre, d'autres des phycobilines qui absorbent surtout dans le vert et le jaune ([5]).

2. — Types de transfert d'énergie.

La question se pose de savoir pourquoi le problème du transfert d'énergie a été soulevé en photosynthèse. La réponse est que ce problème a été soulevé lorsqu'on s'est rendu compte que si un quantum d'énergie lumineuse devait rester dans la molécule de chlorophylle par laquelle il avait été absorbé et devait y accomplir son travail chimique, certains phénomènes de très grande importance ne pourraient pas s'expliquer. Parmi eux, il y avait spécialement le départ rapide de la photo-synthèse après une période d'obscurité, et le fort rendement de la photosynthèse même aux faibles intensités lumineuses ([6]), qui exigerait la collaboration de plusieurs (jusqu'à environ 2 500) molécules de chlorophylle en une « unité photosynthétique ». Certaines suppositions conduisant à ce concept — surtout la nécessité de « rassembler » au moins 4 quanta pour une molécule de CO_2 — ne sont probablement pas valides. Ces considérations seules ne constitueraient donc pas une base solide pour l'idée du transfert d'énergie.

Plus tard, le transfert d'énergie d'un pigment constituant à un autre dans l'appareil photosynthétique (c'est-à-dire d'un caroténoïde ou une phycobiline à la chlorophylle) a été nettement démontré dans plusieurs cas ([7, 8, 9, 10]). En outre, le transfert d'énergie entre plusieurs molécules de même espèce a été démontré *in vitro* ([11]).

Les types suivants de transfert d'énergie et de phénomènes associés se produisent en relation avec la photosynthèse :

1° Transfert d'énergie entre molécules de même espèce;

2° Transfert d'énergie à l'intérieur d'une couche de pigment entre molécules de différentes espèces;

3° Transfert d'énergie d'une couche de pigment « sensu stricto » à une matrice de structure, par exemple un support de protéine;

4° Transfert d'énergie directement d'une couche de pigment, ou du support de protéine à un accepteur d'énergie primaire (c'est-à-dire une molécule capable d'utiliser l'énergie dans une réaction chimique);

5° Transfert d'énergie le long d'une chaîne de phénomènes chimiques, à l'accepteur d'énergie final (CO_2) et à ses dérivés intermédiaires.

Les transferts 1 et 2, et peut-être 3, peuvent être du même type, à savoir transfert par résonance d'énergie ([10]), les transferts 4 et 5s ont probablement différents l'un de l'autre et diffèrent aussi des trois premiers.

On a beaucoup travaillé, ces dernières années, sur plusieurs de ces phénomènes dans le domaine de la photosynthèse. Il est absolument impossible de les passer tous en revue dans le cadre de cet article; en outre, d'autres auteurs traiteront de leurs diverses spécialités. Je me limiterai donc pour ma part à un certain nombre d'observations et de remarques qui se trouvent appuyées par les études poursuivies dans notre laboratoire.

3. — Quelques remarques sur les propriétés de structure de l'appareil pigmentaire qui peuvent être importantes pour les modes de transfert d'énergie.

Dans les plantes supérieures et dans de nombreuses algues, la chlorophylle est confinée dans les chloroplastes qui sont des unités de structure consistant en protéines incolores et en parties plus ou moins clairement distinctes dans lesquelles les pigments sont concentrés ([12]). Examinées au fort grossissement d'un microscope, ces taches peuvent apparaître comme de petits granules verts, les *grana*. Le microscope électronique a montré que les grana étaient constitués par plusieurs disques presque circulaires. Les photographies au microscope électronique les plus récentes, spécialement celles des coupes ultrafines de chloroplastes, suggèrent cependant que les grana ne sont peut-être pas des entités de structure très séparées dans les chloroplastes, mais plutôt des « loci » dans lesquels les pigments sont concentrés, en un système général de lamelles à travers tout le chloroplaste ([13, 14]).

On ne sait pas de quelle façon les chloroplastes sont construits au point de vue moléculaire. La configuration la plus souvent admise est que les molécules de pigment sont placées dans un système de couches alternées hydrophiles (protéine) et hydrophobes (lipides). Ce sont probablement ces couches que l'on voit au plus fort grossissement sur

les micrographies. La chlorophylle elle-même a un noyau porphinique hydrophile et une queue phytol hydrophobe. On suppose que la tête adhère à une surface de protéine et que la queue se dresse à partir de cette surface, associée par d'autres molécules lipophiliques (caroténoïdes).

Il est improbable que tous les caroténoïdes sont actifs en photosynthèse, mais tous les pigments nettement actifs en tant qu'absorbeurs d'énergie lumineuse dans la photosynthèse semblent être intimement liés à la protéine. Il y a différents types de preuves pour cette configuration; nous pouvons dresser une liste de quelques-unes d'entre elles.

1. Une forte liaison protéinique est indiscutable pour les phycobilines : phycoérythrines et phycocyanines; à l'origine on a fait connaître ces pigments comme des protéines dont le « groupe prosthétique » ne se séparait qu'avec grande difficulté. Ces complexes pigment-protéine sont connus pour se séparer relativement facilement des cellules et former des suspensions aqueuses.

2. Des suspensions plus ou moins analogues peuvent être préparées artificiellement à partir de divers organismes photosynthétiques par des moyens mécaniques, par exemple, broyage ([15]) ou désintégration ultra-sonique ([15a]) ou par traitement avec des solubilisants comme la digitonine ([16]). De telles préparations présentent un mouvement amphotère dans les champs électriques ([15]). Dans les bactéries pourpres, on observe souvent une extrusion de pigments comparable à celle des phycobilines mais contenant de la bactériochlorophylle à un état non altéré spectralement et des caroténoïdes. Dans plusieurs cas, les complexes mentionnés en 2) peuvent être des grana plus ou moins « intacts », ainsi qu'il semble résulter des expériences de Oh Eocha dans notre laboratoire.

3. Pratiquement tout pigment lié à la photosynthèse présente un déplacement de sa bande d'absorption par extraction. Pour la bande de grande longueur d'onde c'est un déplacement vers les longueurs d'onde plus courtes. Dans certains cas (bactérioviridine, bactériochlorophylle) ce déplacement est considérable, pouvant aller jusqu'à 100 mμ.

Plusieurs observations laissent supposer une liaison pigment-protéine *in vivo*. Voici certaines des meilleures : dans les bactéries pourpres, la bactériochlorophylle *in vivo* a un spectre d'absorption compliqué dans la région du proche infrarouge; ce spectre est différent selon les souches. L'extraction donne le même maximum de bactériochlorophylle, déplacé considérablement vers le visible pour toutes (fig. 1). Ceci, combiné à certaines des preuves que nous avons discutées plus haut, tend à suggérer que chaque maximum représente un complexe spécial bactériochlorophylle-protéine ([17]). De plus, dans la plupart des cas il semble que l'analyse donnerait plusieurs maxima *symétriques*. Cette analyse est confirmée par le fait que les maxima qui sont « libres » présentent une forme symétrique parfaite qui fait ressortir la réalité de tels complexes de bactériochlorophylle séparés et définis dans la cellule vivante. Le type spécial de la formation de complexe entre le pigment et la protéine détermine évidemment la position du maximum d'absorption (dans le proche infrarouge); on arrive à en distinguer au moins trois différents, probablement dans chaque cellule

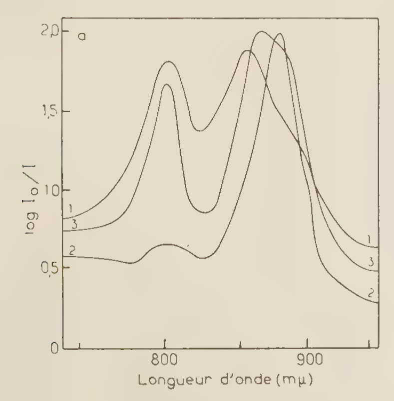
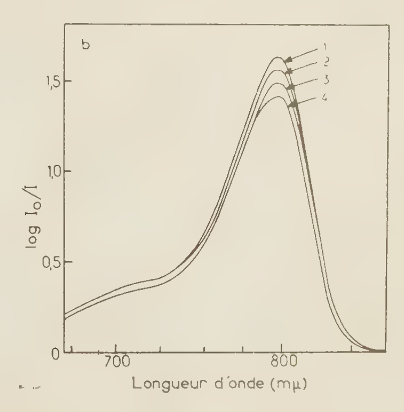


Fig. 1. — *a*) Spectres de la bactériochlorophylle dans l'infrarouge, pour les bactéries pourpres
1. Chromatium spec. « souche D ».
2. Rhodospirillum rubrum, souche 1.
3. Rhodovibrio spec., souche 1.



b) Spectres d'absoprtion dans l'infrarouge de la bactériochlorophylle extraite des bactéries pourpres dans l'alcool éthylique). 1-3 mêmes souches que dans la fig. 1 *a*, 4 Phaeomonas varians, souche 4 (fig. 1 *a*, *b* composées des données de la référence 17).

(fig. 2). On ne sait pas avec certitude si ce sont des liaisons physiques, ou chimiques qui interviennent.

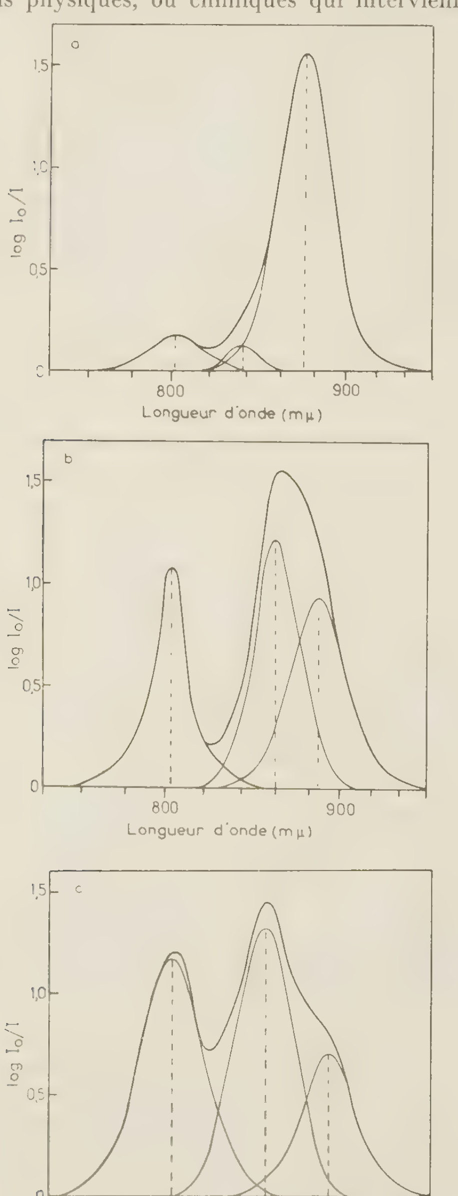


Fig. 2. — Analyse des spectres infrarouges de la bactériochlorophylle dans les bactéries pourpres en bandes symétriques (abscisses linéaires par rapport à E_λ en eV).
a) Rhodospirillum rubrum, souche 1.
b) Rhodovibrio spec., souche 2.
c) Chromatium, souche D (selon la référence 17).

En tenant compte des forts déplacements de la position de la bande, on serait enclin à penser à des liaisons chimiques, mais Jacobs et Holt ([17a]) ont montré qu'il se produit également dans les cristaux de chlorophylle de forts déplacements de la bande d'absorption par rapport à l'état dissous. Dans les bactéries pourpres, leur sensibilité différente à un traitement à la chaleur ([15, 11]) et aux détergents ([18]) apporte une preuve de l'indépendance des divers maxima, ce qui indique l'existence de complexes séparés. Dans les diatomées, le caroténoïde fucoxanthol participe à la photosynthèse ([8]). Par extraction, mais aussi par traitement doux à la chaleur, la couleur brune des diatomées se transforme en vert, par suite du déplacement de la bande d'absorption du fucoxanthol vers les longueurs d'onde plus courtes ([8]), ce qui indique un complexe thermolabile, probablement un complexe pigment-protéine.

Des essais pour solubiliser les complexes pigment-protéine à partir des cellules vivantes comme il est indiqué ci-dessus, produisent des systèmes dont le spectre d'absorption dans de nombreux cas, est presque identique à celui des cellules. Ils contiennent plusieurs pigments. En dépit du fait qu'il ne soit pas certain que toutes les particules aient la même composition de pigment, cela semble très probable. Dans le cas des bactéries pourpres, très probablement un système pigment-protéine, tel qu'il a été isolé, contient les trois maxima de la bactériochlorophylle. Ainsi qu'il a été indiqué plus haut, on peut faire une séparation partielle des complexes individuels en chauffant avec précaution. Dans notre laboratoire Oh Eocha ([18]) a tenté de faire une séparation en utilisant des détergents (en se basant sur les résultats des expériences de E. L. Smith avec la digitonine) et a observé tout d'abord une diminution du maximum à 890 mμ, ce qui est très semblable à ce que l'on obtient par traitement à la chaleur ([18]). Il semble intéressant de continuer à travailler dans cette voie en combinaison avec l'électrophorèse sur papier.

On peut résumer la discussion qui précède en disant que, pour les discussions sur les modes possibles de transfert d'énergie, on peut avec assez de certitude supposer que la chlorophylle est intimement liée à la protéine et qu'elle est aussi étroitement associée à d'autres pigments. Les protéines sont probablement en couches qui s'étendent à travers tout le chloroplaste et sont localement munies de pigments.

4. — Remarques sur les phases successives du transfert d'énergie.

Forster ([11]) a calculé que, dans une solution de chlorophylle, une distance moyenne des molécules de 80 Å produit environ 50 % du transfert d'énergie. Cette concentration est environ 0,01 fois celle qui

existe dans les chloroplastes. Puisque la probabilité de transfert augmente avec le carré de la concentration, Förster conclut que dans un chloroplaste, dans lequel la concentration de chlorophylle est environ 100 fois la concentration ci-dessus, l'excitation pendant sa durée de vie pourrait « visiter » 10^4 molécules. Ceci implique naturellement que la probabilité de l'annihilation de l'excitation dans un chloroplaste devrait être comparable à celle *in vitro*. Si l'on suppose que l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle est une mesure pour cette probabilité, on pourrait conclure que, puisque l'intensité maximum de fluorescence *in vivo* est beaucoup plus faible que celle *in vitro* (en dépit du fait que les valeurs données pour la première se sont récemment accrues jusqu'à l'ordre de 1 %), on devrait s'attendre à une durée de vie moyenne plus courte *in vivo*. Des mesures récentes faites par Brody ([19]) confirment qualitativement cette conclusion (les durées de vie moyennes étant respectivement d'environ 5 et 1,5 10^{-9} sec. *in vitro* et *in vivo*) mais la différence est plus faible que ce à quoi l'on pouvait s'attendre. De toute façon, Rabinowitch ([20]) conclut que, sur la base de ces mesures, la durée de vie est assez longue pour permettre plusieurs milliers de transferts d'énergie.

Selon Duysens ([10]), le type du transfert d'énergie à l'intérieur du système de pigment est du type par « résonance inductive ». Dans les quinze dernières années, il a été démontré que le transfert d'énergie d'un pigment à un autre se produit sur une grande échelle dans tous les organismes photosynthétiques. Pour le démontrer, on s'est servi de la fluorescence sensibilisée. Le transfert s'opère des bandes d'absorption (excitation) de longueurs d'onde plus courtes à celles de plus grandes longueurs d'onde. La première démonstration de ce type a été l'observation de la fluorescence sensibilisée de la chlorophylle *a*, dans les diatomées, par absorption de lumière dans la fucoxanthine, caroténoïde probablement fortement lié à la protéine ([7, 8]). Un transfert d'énergie interpigment à depuis été observé dans toutes les classes d'organismes photosynthétiques. En général, seul le dernier pigment accepteur présente de la fluorescence, les autres n'en présentent pas, comme la chlorophylle *b* dans les cellules vertes. Il est à remarquer que les phycobilines présentent de la fluorescence, malgré un transfert d'énergie abondant à la chlorophylle *a*. Dans les cellules vertes, le dernier pigment fluorescent est la chlorophylle *a*, dans les bactéries pourpre c'est le complexe bactériochlorophylle-protéine à grande longueur d'onde avec absorption dans le proche infrarouge pour 890 mμ. Nous ne donnons pas ici de détails sur des groupes spécifiques tels que les algues rouges et bleues (voir par exemple [10, 21]).

On suppose que le transfert d'énergie par résonance exige un chevauchement des bandes mutuelles d'émission et d'absorption. Selon ce raisonnement, les chlorophylles pourront difficilement transférer leur énergie à quelque chose de très différent. Une indication dans ce sens est donnée par les études récentes de Kok, dans notre laboratoire, sur les modifications spectrales d'absorption pendant l'irradiation des organismes photosynthétiques ([22]). On espère que ces études donneront des indications sur les routes de transfert d'énergie dans les réactions subséquentes. En dehors de la confirmation de plusieurs modifications d'absorption qui avaient déjà été observées, Kok a trouvé très régulièrement une modification dans tous les organismes contenant de la chlorophylle, modification qui se manifeste par une diminution distincte de l'absorption pour ∼ 705 mμ, ce qu'il attribue à un pigment jusqu'à présent inconnu; la disparition de l'absorption pourrait être due à un transfert d'énergie à partir de la chlorophylle *a*. La méthode que Kok a utilisée était de détecter la disparition des modifications d'absorption immédiatement après des flèches de lumière intenses et brèves. Évidemment le pigment mentionné peut être le dernier pigment, piège d'énergie.

La phase suivante du transfert d'énergie est beaucoup moins claire. Par exemple on ne sait pas si le dernier pigment piège détectable subit une réaction chimique. La modification d'absorption mentionnée aux environs de 705 mμ pourrait être la conséquence d'une telle réaction, elle pourrait aussi occasionner des modifications couplées dans d'autres parties du spectre. Kok a fait la suggestion que l'autre modification qui se produit généralement aux environs de 425 mμ est liée à celle qui se produit à 705 mμ. Cette conclusion se trouverait appuyée par une autre des observations de Kok, à savoir : que l'on a trouvé deux maxima de diminution d'absorption de positions plus ou moins semblables dans un système *in vitro* contenant de petites quantités d'acide ascorbique et de thiourée. Une autre suggestion qui est probablement plus plausible est que la modification pour 425 mμ vient d'un cytochrome et est liée à une modification plus faible aux environs de 555 mμ ([23, 24]). Selon l'opinion de l'auteur du présent article, la probabilité de cette dernière suggestion est fortement accrue par le fait que l'on observe aussi des maxima pour 425 et 555 mμ dans les bactéries pourpres ([24]) dans lesquelles il ne se produit pas de chlorophylles « ordinaires ».

Sur la figure 3 sont combinées certaines données sur les spectres de différence. La courbe *a* est une moyenne de 3 courbes de Kok pour des cellules de plantes vertes ([22]), la courbe *b* une moyenne de ses courbes pour les algues bleues et rouges, comparer aussi les différences mentionnées dans les bactéries pourpres ([24]). Les maxima négatifs à 425

et 555 existent dans la plupart des cas. La figure montre que la courbe des algues à phycobilines présente un nombre moins important de grandes déviations que celle des cellules vertes.

De fortes modifications dans les cellules des plantes vertes aux environs de 640-680, beaucoup moins prononcées dans les algues rouges et bleues, font penser à une relation avec la chlorophylle *b*. Les modifications les plus importantes, probablement spécifiques des cellules de plantes vertes, à savoir à 475 et 520 mμ sont encore inexpliquées; on ne sait pas si elles sont dues à un seul pigment.

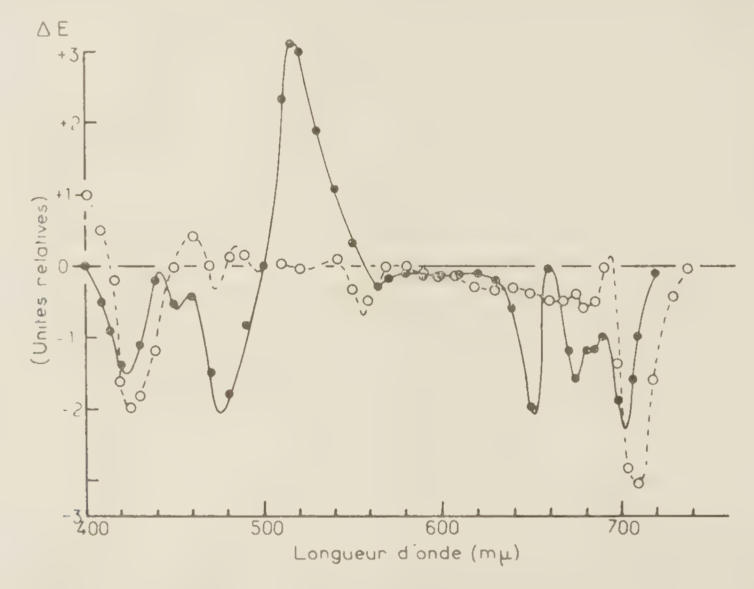


Fig. 3. — Spectres de différence d'absorption d'algues (extinction de la flèche). Courbe en traits pleins : algues vertes, moyenne de trois courbes, courbe en pointillés : algues rouges et bleues (moyenne). Tirées des données de la référence 22.

Dans notre laboratoire, OLSON et KOK ([25]) ont récemment étudié le spectre de différence des bactéries pourpres en faisant varier certaines conditions (voir ci-dessous).

Dans plusieurs cas, on a observé de nombreuses autres modifications, plus faibles et en partie pas toujours reproductibles.

La question se pose de savoir si ces modifications ont quelque chose à faire avec le circuit de transfert d'énergie en photosynthèse. Le fait qu'elles se produisent par irradiation n'est pas une garantie. Ce sont de faibles modifications, probablement dues à des systèmes de pigments présents à des concentrations environ 100 à 1 000 fois plus faibles que celle de la chlorophylle. Il est probable, *a priori*, que ce sont principalement des modifications oxydo-réductrices dans les composants des équilibres d'oxydo-réduction. On sait que, dans les suspensions de micro-organismes, on peut mesurer les potentiels d'oxydo-réduction. Par irradiation, ils présentent à la fois des modifications de l'état inductif et de l'état stationnaire, qui sont très reproductibles, surtout pour les derniers. Dans les bactéries pourpres sulfureuses, dans le système $N_2 \pm H_2 \pm CO_2$ (H_2 et CO_2 étant respectivement le réducteur et l'accepteur), ils répondent nettement aux conditions de la suspension ([26, 27]) et ne sont pas liés à la vitesse de l'échange de gaz. Ils sont donc liés avec une partie plus intime du mécanisme et ne doivent pas être attribués à un produit final quelconque de la réaction (fig. 4).

La mesure de ces potentiels dans une suspension de cellules est un problème en soi. On admet généralement que la cellule excrète un système d'oxydo-réduction reversible, transmettant les modifications intracellulaires à l'électrode. L'absorption de lumière provoque une forte perturbation de l'équilibre en donnant naissance à de grandes quantités de composés réduits et oxydés. On doit se rendre compte que quelque chose comme un changement général du niveau d'oxydo-réduction de la cellule peut se produire, impliquant plusieurs systèmes d'oxydo-réduction de capacité plus faible, changement qui pourrait bien s'accompagner de légères modifications de l'absorption.

Il est, par suite, important de connaître leur grandeur par rapport à la capacité de la chaîne photosynthétique. A cet égard les récents calculs faits par OLSON et CHANCE ([24]) sont d'une grande valeur. Grâce à une étude quantitative des modi-

fications respectives d'absorption spectrale dans les bactéries pourpres, ils ont estimé le rendement quantique de l'oxydation du cytochrome-423,5 dans la cellule intacte qu'ils admettent être une réaction partielle en photosynthèse. Selon certaines suppositions, cette estimation a donné 2 quanta par élec-

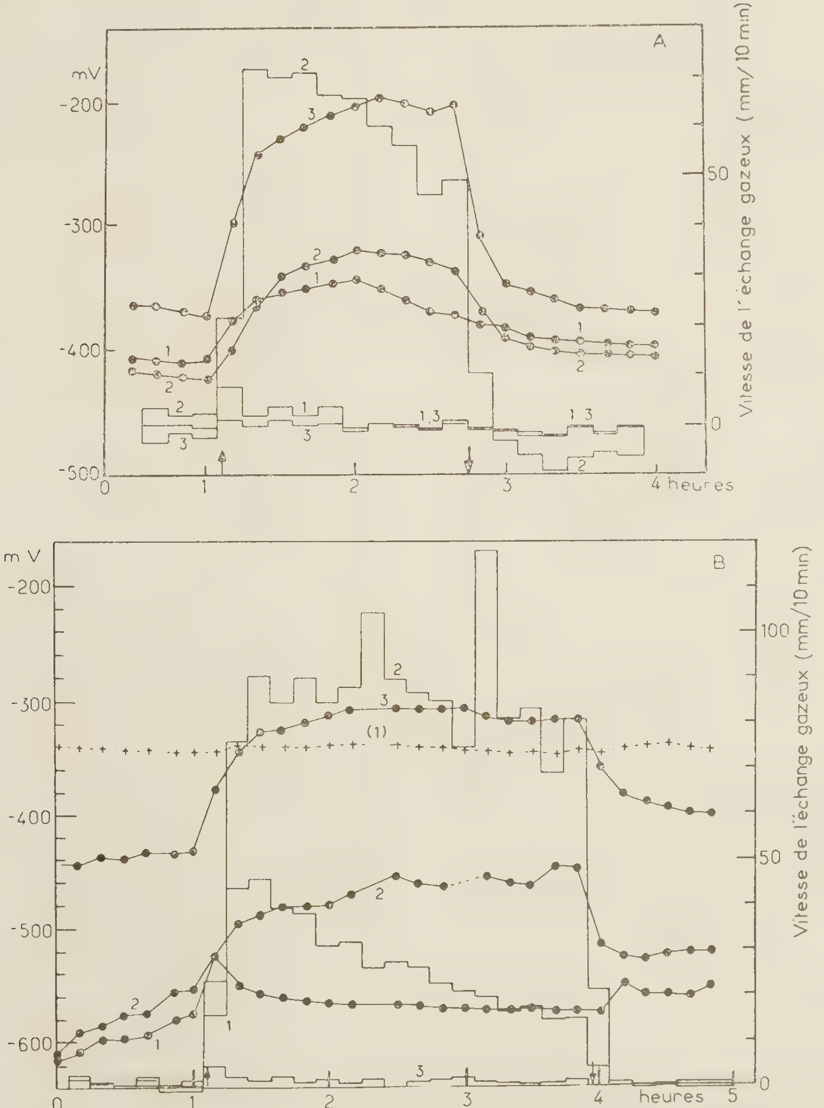
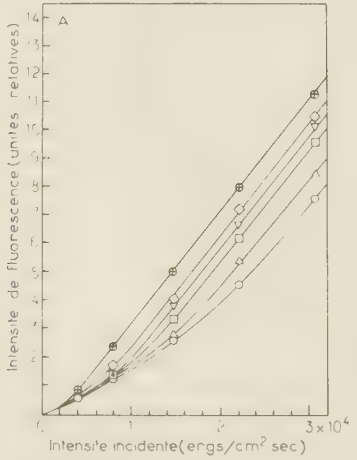


Fig. 4. — Observations simultanées des changements du potentiel d'oxydo-réduction et de l'échange gazeux dans des suspensions de Chromatium, souche D. Blocs : échange gazeux; courbes: potentiels 1. N_2+H_2, 2. $N_2+H_2+CO_2$, 3. N_2+CO_2.
A. pH 6,6. — B. pH 8,0, courbe pointillée : électrode de verre.
Tampons au phosphate à 29 °C (A : réf. 26, B : non publiée).

tron, ce qui est aussi bon que la valeur la plus élevée donnée pour la photosynthèse complète dans ces bactéries [à savoir ~ 8-9 quanta par molécule de CO_2 (4)]. OLSON et CHANCE tirent la conclusion que, pendant l'irradiation, les cytochromes sont « la voie principale du transfert d'énergie des composés soufrés réduits au photo-oxydant ».

Ces composés soufrés réduits agissent comme des donneurs d'hydrogène pour la réduction de CO_2 dans les bactéries pourpres sulfureuses. Le fait qu'ils soient plus directement occupés que CO_2 du transfert d'énergie lumineuse a été conclu antérieu-

rement d'observations combinées de photosynthèse et de fluorescence de la chlorophylle [4]. La conclusion a été que le donneur d'hydrogène est rendu disponible pour les systèmes de transfert d'énergie grâce à une réaction chimique dans l'obscurité, puisque la courbe de fluorescence en fonction de l'intensité lumineuse est influencée de façon semblable par la diminution de la température et par la diminution de la fourniture de donneur d'hydrogène. D'autre part, la diminution de la fourniture de CO_2 donne des courbes de fluorescence en fonction de l'intensité à partir de cet état [30]. Cette supposition semble rendre légèrement plus difficile la compréhension des nombreuses observations sur les relations qui existent entre la fluorescence de la chlorophylle et d'autre phénomènes liés à la photosynthèse [31]. Pour les mécanismes de la photosynthèse il faudra aussi prendre en considération les conséquences de la perte que cela implique pour la teneur en énergie des quanta disponibles. En outre, la durée de vie de l'état fluorescent semble assez longue pour permettre de très nombreux transferts d'énergie [20].



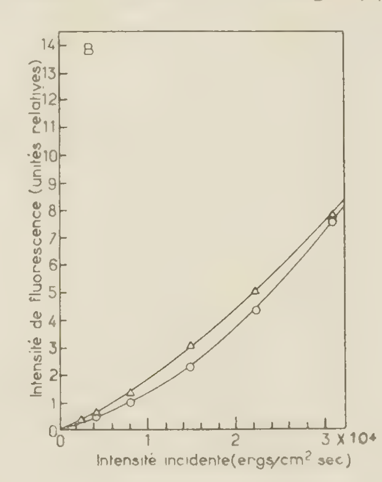


Fig. 5. — Intensité de fluorescence en fonction de l'intensité incidente dans des suspensions de chromatium, souche D.

A) Dépendance de la concentration en donneur d'hydrogène (courbe supérieure: concentration zéro, les autres: concentration croissante).

B) Avec (courbe inférieure) et sans (supérieure) CO_2. Les deux avec excès de donneur d'hydrogène (A et B selon la réf. 4).

lumineuse d'un type très différent [4] (voir fig. 5).

Ces considérations sont basées sur le point de vue que l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle dans une cellule photosynthétique est une mesure de la concentration de l'état excité et, *mutatis mutandis*, de la probabilité du transfert d'énergie. Cette probabilité dépend des concentrations des composés les plus importants tout au long de la ligne subséquente du transfert d'énergie. Pendant l'irradiation, ces concentrations se déplaceront plus ou moins graduellement de leurs valeurs dans l'obscurité aux valeurs correspondant au niveau actuel d'intensité lumineuse. On peut concevoir que ces déplacements sont la cause des nombreux phénomènes d'induction observables liés à la photosynthèse. La durée de ces phénomènes varie de fractions de seconde [28] à plusieurs minutes [29].

Pendant les quelques dernières années, il a été d'autre part suggéré que la chlorophylle, à la suite d'une excitation de courte durée de vie émettant de la fluorescence, entrait dans un état métastable (triplet), caractérisé par une bande d'absorption à environ 860 mμ et que la « chimie » commençait

Antérieurement nous avons attiré l'attention sur le fait que, pour des objets comparables, de nombreux types de phénomènes d'induction de la photosynthèse sont étonnemment semblables en ce qui concerne leur aspect et leur durée [32]. Parmi eux citons les phénomènes de fluorescence, la production d'oxygène, les déplacements des potentiels d'oxydo-réduction et les phosphorylations.

Une autre particularité intéressante, liée à ce qui a été dit ci-dessus au sujet de la fluorescence et de la photosynthèse dans les bactéries pourpres, est que, dans plusieurs cas, les parties initiales des courbes d'induction sont indépendantes de CO_2 [29, 33, 62]. Cela ne veut naturellement pas dire qu'elles sont nécessairement indépendantes des produits intermédiaires, formés auparavant avec l'aide de CO_2.

On a trouvé que les bactéries pourpres sulfureuses répondaient de façon définie aux modifications du niveau d'oxydo-réduction. Une combinaison des courbes donnant l'intensité de fluorescence de la bactériochlorophylle en fonction de l'intensité lumineuse à des concentrations différentes du donneur

d'hydrogène (fig. 4) avec les observations des potentiels d'oxydo-réduction démontre directement que la diminution du donneur d'hydrogène provoque un accroissement de fluorescence (donc une diminution de la probabilité du transfert d'énergie) et un déplacement du potentiel d'oxydo-réduction du côté oxydé. Dans ces bactéries, donc, un état plus réduit semble favoriser le transfert d'énergie. Dans les algues vertes, la production d'oxygène abaisse la fluorescence, et augmente donc le transfert d'énergie [3]. Il n'est cependant pas certain que ce soit un transfert d'énergie « utile »; on a des indications pour penser que l'oxygène rivalise avec succès avec les accepteurs plus « vitaux » pour l'énergie d'excitation de la chlorophylle. Il n'est probablement pas suffisant de supposer que l'oxygène rivalise simplement avec CO_2 comme accepteur final d'énergie (de quelque forme chimique de l'énergie transférée, soit une sorte de pouvoir réducteur) puisque cela n'influencerait probablement pas la fluorescence de la chlorophylle [34].

Nous avons vu que les cytochromes constituent probablement un chaînon important dans la chaîne de transfert d'énergie dans les premiers stades de la photosynthèse. Un autre type de composés d'importance possible sont les nucléotides de pyridine. Duysens et Sweep [35] ont récemment démontré que, dans les bactéries pourpres et les algues bleues, des « spectres de différence de la fluorescence » se produisent par irradiation, probablement par suite d'une réduction (provoquée par la lumière) du nucléotide de pyridine en photosynthèse. Une estimation quantitative de cet effet n'a pas encore été possible. Dans les récents schémas de photosynthèse, on trouve souvent des nucléotides de pyridine entre la chlorophylle et les cytochromes. Duysens et Sweep [35] considéraient la spectrophotométrie de la fluorescence comme une méthode encore mieux adaptée pour étudier la participation de ces composés en photosynthèse, puisque l'interférence par les autres pigments est plus faible que dans la spectrophotométrie d'absorption.

Pour l'étude de la relation qui existe entre les spectres de différence d'absorption et la chaîne de transfert d'énergie de la photosynthèse, les travaux qui ont été récemment commencés dans notre laboratoire par Spruit [36] et par Kok [22] peuvent avoir de l'importance. Spruit a tué les Chlorelles par congélation et a trouvé que, entre 450 et 600 mμ, les modifications d'absorption sont très réduites. En particulier les grandes modifications à 519 et 476 mμ sont tout à fait absentes. La modification la plus régulière est une petite bande négative à environ 554 mμ et une bande positive aux environs de 565 mμ. La bande négative ressemble beaucoup à celle du cytochrome *f*, devenant oxydé par irradiation. On estime que le fait qu'il n'y ait pas de grandes bandes rend impossible que les fortes modifications à 519 et 476 mμ soient liées au premier accepteur d'énergie provenant de la chlorophylle excitée. Cette conclusion se trouve appuyée par le fait que ces déplacements sont plus ou moins absents dans les algues bleues et rouges intactes (voir ci-dessus). Il y a quelque temps et tout récemment encore, Witt a, il est vrai, attribué les modifications à ces longueurs d'onde à des réactions très voisines de la chlorophylle excitée [28].

Dans notre laboratoire, Olson et Kok [25] ont récemment poursuivi des études pour savoir si la bande positive observée dans les spectres de différence des bactéries pourpres à 436 mμ devrait être attribuée à de la bactériochlorophylle oxydée (de façon reversible) [23]. Ils ont utilisé la technique de Kok [22] pour mesurer le rapide renversement des modifications entre deux éclats de lumière et pour mesurer en même temps l'accumulation des modifications dues à une grande série d'éclats (modifications de l'état stationnaire). La relation entre ces deux types d'observations peut être semblable à celle qui existe entre, par exemple, les modifications de la fluorescence de la chlorophylle pendant la phase d'induction d'une période d'irradiation et celles dues à une irradiation stationnaire. En bref, Olson et Kok [25] ont trouvé que la modification à 436 mμ ne se produit que comme effet de l'état stationnaire dans les conditions non physiologiques, tandis que les modifications de la bactériochlorophylle dans le proche infrarouge se produit à la fois comme effets de l'état rapidement reversible et comme effets de l'état stationnaire. Autant qu'on puisse en juger d'après ces données, les modifications dans le proche infrarouge sont plus faibles dans des conditions physiologiques. Elles peuvent être comparables à celles qui se produisent dans des cellules contenant de la chlorophylle ordinaire dans la région située entre 600 et 700 mμ [voir Kok [22]].

Olson et Kok (*l. c.*) ont trouvé la modification négative à 422 mμ, attribuée conformément à ce que nous avons dit antérieurement à un cytochrome, dans toutes les conditions, à la fois comme modifications stationnaire et comme modification rapidement réversible. Quant à la substance inconnue responsable du maximum à 436 mμ, ils déclarent que son accumulation relativement lente pendant l'irradiation indique que ce n'est pas un intermédiaire dans les réactions entre la bactériochlorophylle et les cytochromes au cours de la photosynthèse.

En admettant, d'après les preuves brièvement discutées dans les pages qui précèdent, que les cytochromes sont des transporteurs d'énergie le long de la chaîne de photosynthèse, et probablement aussi les nucléotides de pyridine, et en tournant en arrière vers le transfert d'énergie à l'intérieur du système de pigment, nos connaissances en ce qui

concerne les stades intermédiaires semblent encore présenter des lacunes.

On a pensé à la participation de plusieurs autres transporteurs d'électrons entre le chlorophylle « excitée » et les cytochromes, surtout l'acide thioctique, que l'on a pensé être le premier accepteur d'énergie ([37]), la vitamine K ([38]) et la mono-nucléotide de flavine ([39]). L'espace accordé à cet article ne nous permet pas d'analyser les raisons qui ont conduit à ces suggestions.

Nous traiterons maintenant brièvement de la transition d'énergie du système pigment aux composés du transfert dont on a établi ou suggéré l'existence ainsi que nous l'avons vu ci-dessus. Puisque les spectres d'absorption de ces composés n'ont pas de relation spécifique avec la bande d'excitation rouge de la chlorophylle (et *mutatis mutandis* avec la bande d'excitation dans l'infrarouge de la bactériochlorophylle), un transfert ultérieur par « résonance inductive » semble impossible, si bien qu'il faut envisager un autre type de transfert. Deux possibilités se présentent à l'esprit : 1° L'accepteur d'énergie est directement lié au dernier pigment piège, et, en recevant l'énergie, se sépare en un agent oxydant et un agent réducteur. 2° L'accepteur d'énergie est lié au support de protéine des pigments, et un électron est conduit du dernier pigment piège à l'accepteur via la protéine.

La première possibilité fait penser que le dernier pigment piège uni à l'accepteur d'énergie est la molécule piège d'une « unité photosynthétique », que l'on pense ou non que cette unité est parfaitement localisée. Le transport d'énergie à travers la couche de pigment seule répond alors à la qualification de FÖRSTER : « ein diffusionsartiger Wanderungsvorgang » (« exciton ») zu räumlich lokalisierten Reaktionszentren » ([11]).

La seconde possibilité a été en tout premier suggérée par SZENT-GYÖRGYI ([40]), qui considère la protéine comme une structure semblable à un métal ou un semi-conducteur (voir [41]). A la même époque l'auteur du présent article et ses collaborateurs ont suggéré ce type de transfert pour la photosynthèse, à la suite de recherches sur la fluorescence de la bactériochlorophylle et la photosynthèse, ainsi qu'on peut le voir de la citation suivante ([42]).

« L'énergie absorbée par une certaine molécule de chlorophylle peut migrer vers l'accepteur d'énergie, en principe selon deux voies, à savoir : par la couche de pigment ou par la protéine. La migration à travers la couche de pigment pourrait être telle que ce que l'on a imaginé pour la migration de l'énergie d'excitation dans les cristaux, par exemple dans les cristaux d'halogénures d'argent... D'autre part le quantum d'énergie peut, directement ou indirectement après une migration à travers la couche de pigment, passer à la protéine et y migrer sous une forme quelconque vers l'accepteur d'énergie. On pourrait imaginer que cette forme est celle d'un électron migrant. On peut concevoir qu'un électron, mobilisé par l'absorption d'un quantum dans la chlorophylle, rejoignant l'accepteur d'énergie change un ion H en un radical, lequel radical est alors actif dans la réduction de CO_2 ».

KATZ ([43]) a, dans ses travaux, poursuivi cette même idée, en imaginant un mouvement (plus ou moins indépendant) « électron et trou », et en insistant que dans cette représentation (dans laquelle l'électron est l'agent réducteur et le trou l'agent oxydant) ces deux agents sont mobiles et se déplaceront » indépendamment, en réalisant oxydation et réduction à différents endroits » (*l. c.* p. 292).

Disons en passant que cette séparation locale d'oxydation et de réduction a été confirmée par les observations de SPRUIT ([43a]) dans notre laboratoire; il a trouvé une production simultanée d'hydrogène et d'oxygène à la lumière chez Chlorella laissée dans des conditions anaérobiques pendant une courte période de temps. Ces observations ont été récemment confirmées et étendues.

L'idée d'un type « semi-conducteur » de transport d'énergie a été récemment reprise de divers côtés ([44, 45, 46]). ARNOLD et SHERWOOD ([44]) ont donné un support expérimental à l'analogie des chloroplastes avec les semi-conducteurs, ainsi que pour les suspensions de Chlorella et les feuilles. On n'a pas encore pu démontrer une photoconductivité directe, comme on l'a pu dans les films secs de chlorophylle ([47]). ARNOLD et SHERWOOD ne disent pas spécifiquement que la bande de conduction dans les chloroplastes implique la participation de la protéine. Cette possibilité a été discutée, par exemple par ÉVANS et GERGELEY ([41]). Autant que je le sache, on ne possède pas de démonstration directe du transport d'énergie à travers ou le long des couches de protéine des chloroplastes. Si jamais on arrive à mettre en évidence un tel transport, il est possible qu'il soit d'un type différent de celui observé par BÜCHER et KASPERS ([48]), dans lequel le CO provenant de la CO-myoglobine peut être dissocié par l'énergie lumineuse absorbée directement par la protéine (280 mμ). L'activité photosynthétique de la lumière absorbée par la protéine des chloroplastes n'a jusqu'à présent pas encore été trouvée et n'existe probablement pas.

ARNOLD et ses collaborateurs avaient auparavant observé que les plantes vertes émettaient de la lumière pendant quelques secondes, après avoir été irradiées ([49, 50, 51]). Les spectres d'action et d'émission pour cette lumière sont les mêmes que les spectres correspondants pour la photosynthèse et la fluorescence. Ce phénomène présente une saturation lumineuse à une intensité de lumière relativement faible. La production retardée de lumière semble indiquer que les stades primaires de la photosynthèse sont rever-

sibles et peuvent redonner le pigment excité. Ces stades peuvent représenter les électrons qui viennent d'être « piégés », comme les courbes de luminescence produites par les chloroplastes par chauffage après irradiation ([44]).

Strehler ([52]) a récemment fait un rapprochement entre la luminescence de la chlorophylle et les modifications du spectre d'absorption. La durée de certaines modifications spectrales et de la luminescence, de même que la façon dont ces deux phénomènes dépendent de l'intensité lumineuse sont très semblables. Strehler considère spécifiquement les modifications d'absorption à 480, 520, 648 et 660 mμ.

Il a trouvé que les modifications les plus importantes à 520 et 480 mμ changent de signe pendant une phase d'induction; un spectre publié par Strehler qui se rapporte à des périodes très brèves d'irradiation (*l. c.*, fig. 7) est en réalité l'inverse de spectres semblables obtenus par Duysens et d'autres. Strehler établit une relation entre les modifications spectrales mentionnées et une réaction primaire d'oxydo-réduction dans laquelle la recombinaison des premiers photoproduits provoque la luminescence ou bien la génération de phosphates riches en énergie. Cette représentation tentante semble, cependant, quelque peu incertaine si l'on tient compte de l'observation faite par Kok, discutée ci-dessus, selon laquelle les modifications à 480 et 520 mμ sont presque absentes dans les spectres dedifférence des algues bleues et rouges, quoique ces travaux doivent être poursuivis.

Si nous revenons maintenant du transfert d'énergie immédiatement après la chlorophylle — sur lequel, nous l'avons vu, on ne connaît pas encore grand' chose — à la chaîne de transfert, nous nous arrêterons un peu sur le rôle des composés phosphates. Cela a conduit à des études poussées sur la « phosphorylation photosynthétique » que nous ne pouvons discuter ici en détail ([53]). Dans ce processus, l'énergie lumineuse engendre plus ou moins directement des liaisons phosphate à grande énergie.

Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à ce sujet depuis plusieurs années. Le point de départ de ces travaux a été la considération qu'un cycle $P_i \xrightarrow{h\nu} \sim P \xrightarrow{CO_2} P_i$ peut se dérouler avec réduction du gaz carbonique et que la seconde phase peut être inhibée par manque de gaz carbonique, si bien que l'on peut s'attendre à un net accroissement, d'incorporation de P_i dans les composés organiques P. C'est ce que l'on a trouvé, en fait, dans les bactéries pourpres sulfureuses ([54]) et dans les organismes verts ([55, 56]). Wintermans ([57]) a démontré qu'en l'absence de CO_2, des composés de type polyphosphate s'accumulent graduellement. Ils ne sont pas facilement réversibles et peuvent, plus ou moins, être comparés à l'amidon dans les chaînes de carbone. Leur accumulation spécifique, lorsque CO_2 est limité, est un support direct de l'existence d'un cycle de phosphate photosynthétique et de « phosphorylation photosynthétique » ([57 a]). Arnon et ses collaborateurs ([53]) ont démontré la phosphorylation photosynthétique (génération de triphosphate d'adénosine) dans des préparations de chloroplastes. Kandler a été le premier à observer des fluctuations du niveau de phosphates non organiques après le début de l'irradiation ([59]). Des travaux analogues, à une échelle de temps légèrement plus rapide, ont été faits dans notre laboratoire ([60]). On a pensé ([32]) à des relations entre les fluctuations observées et la formation de ATP, telle que l'a étudiée Strehler ([67]). Une bosse spécifique, se produisant à environ 10 s d'irradiation dans nos études, semblait être due à un autre composé ([32]).

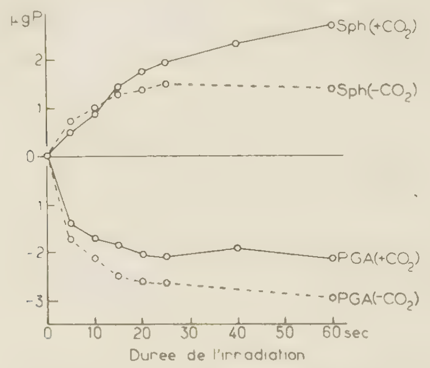
Lindeman ([62]), dans ce laboratoire, a commencé des études chromatographiques et radio-autographiques du cours des composés phosphates organiques dans Chlorella dans les conditions générales de nos expériences, après de brefs intervalles compris entre 5 et 60 s après le départ de l'irradiation. Pendant cet intervalle, en présence de CO_2, P_i présente une décroissance de même que PGA. Les phosphates de sucre et les nucléotides augmentent, ces derniers tendent à décroître à nouveau après environ 30 s.

Lindeman est enclin à conclure que la disparition de P_i n'est pas représentative du total de la phosphorylation (formation d'ATP). L'accroissement des nucléotides démontre la « phosphorylation photosynthétique »; au même moment, cependant, des nucléotides disparaissent probablement dans la réduction de PGA, si bien que le total de la « phosphorylation photosynthétique » est au moins la somme des deux.

Lindeman (*l. c.*) a examiné les mêmes relations en l'absence de CO_2. Elles présentent des déviations par rapport à celles trouvées avec CO_2, mais ces déviations ne débutent qu'après environ 20 s d'irradiation (fig. 6). Ce résultat a aussi été trouvé dans d'autres études sur les phénomènes d'induction, comme par exemple les études de la fluorescence de la chlorophylle ([29]) et des potentiels d'oxydo-réduction ([33]). L'interprétation la plus plausible est que la chaîne de transfert d'énergie débute en utilisant des réservoirs d'intermédiaires (dérivés finalement de périodes antérieures de photosynthèse), dont la concentration relative est principalement déterminée par le métabolisme dans l'obscurité et l'antérieur pré-traitement. Après environ 20 s, ces réservoirs ont, évidemment, tellement varié que leur ajustement par une nouvelle incorporation de CO_2 devient déterminant pour la vitesse. Les expériences que nous sommes en train de discuter sont faites à la saturation lumineuse pour la photosynthèse stationnaire.

On suppose généralement que la génération de liaisons phosphate riches en énergie en photosynthèse est due à une recombinaison de photoproduits primaires réduits et oxydés (voir par exemple [65]).

fortement déviée vers le côté C, en partant d'une teneur normale en azote de 8 à 10% ([67]). Cela arrive lorsqu'on laisse la photosynthèse se produire dans les cellules en absence d'azote; la teneur en azote tombant graduellement jusqu'à environ 2 ou 3%. De



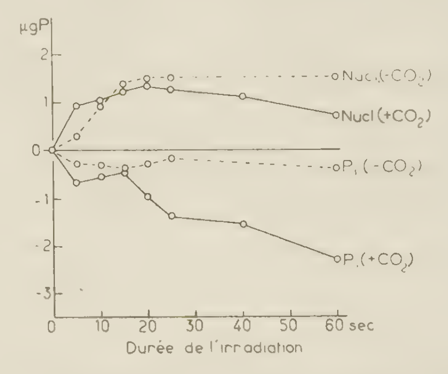


Fig. 6. — Cours de l'acide phosphoglycérique (PGA), des nucléotides, des phosphates de sucre et du phosphate inorganique (P_i) dans Chlorella soumise à une irradiation, en présence et en l'absence de CO_2 (composé de la réf. 62) (Ordonnées : µg P par 40 mm³ de cellules).

Il est à remarquer ici que plusieurs phénomènes concourant à la photosynthèse, et en partie surtout à ses stades initiaux, dépendent de l'intensité lumineuse d'une façon qui peut être très différente de celle de la photosynthèse à l'état stationnaire. Certains exemples tirés de la littérature récente ([29, 33, 50, 63, 64]) ont été rassemblés sur la figure 7. Il ne nous paraît pas nécessaire de les discuter en détail. D'une façon générale, il est probable que ces courbes d'intensité lumineuse reflètent en partie le remplissage des réservoirs avec les produits intermédiaires le long du circuit de transfert d'énergie, ou, dans d'autres cas, la dépendance de leur niveau stationnaire sur les intensités lumineuses. Il semblerait que le fait de les établir avec certitude et d'en faire une étude comparative puisse donner de nouveaux renseignements utiles en ce qui concerne le chemin du transfert d'énergie en photosynthèse.

La réduction de PGA en phosphate de triose est de loin la plus importante entrée, ou probablement la seule entrée de l'énergie lumineuse transférée dans le « cycle du carbone », le mécanisme compliqué de la réduction du CO_2 en sucres en photosynthèse; tel qu'il a été élucidé principalement par Calvin et ses collaborateurs ([66]).

Avec la formation d'hydrates de carbone, le circuit du transfert d'énergie en photosynthèse est achevé : nous en avons donc terminé avec notre histoire. Il semble, cependant, utile d'ajouter quelques observations sur le sort ultérieur de cette énergie, puisque pour la plante débute à ce moment une seconde et encore plus importante histoire. Des études avec des algues, poursuivies dans notre laboratoire et ailleurs, ont montré que la relation carbone-azote peut être telles cellules assimileront l'azote (provenant de nitrates ou de sels d'ammonium) dans l'obscurité, tandis que les cellules « normales » ne le feront pas. Ceci prouve que l'assimilation d'azote exige des chaînes de carbone organique. A la lumière, l'assimilation de l'azote se fait simultanément avec la photosynthèse. Si, cependant, il n'y a pas alimentation en gaz carbonique, l'azote sera réduit en ammonium (NH_3), excrété dans le milieu ([67]). Ceci constitue un chemin de transfert d'énergie lumineuse à partir de la chlorophylle qui apparaît sans utilité, à moins que des hydrates de carbone ne soient disponibles pour incorporer les groupes azotés réduits. Apparemment, aucun composé organique ou non-organique avec de l'azote en excès ne peut se former et s'accumuler, la présence de composés carbonés à une concentration suffisante étant nécessaire au préalable pour une assimilation efficace de l'azote ([67]).

Plusieurs autres phénomènes dans les cellules des plantes sont des réactions photiques, par exemple le phototropisme, le photopériodisme et les phénomènes photomorphogénétiques. En général, ils sont déclenchés par de petites quantités de lumière, mais pour se réaliser, ils exigent l'énergie disponible dans la cellule, par exemple sous forme de produits de la photosynthèse. Ces processus sont donc du type « amplificateur », ils provoquent un couplage entre une impulsion d'énergie lumineuse et une source d'énergie indépendante ([68]). Les preuves s'accumulent pour établir que certains phénomènes photomorphogénétiques ne peuvent se réaliser que si un niveau d'énergie suffisamment élevé est disponible ([69, 70]).

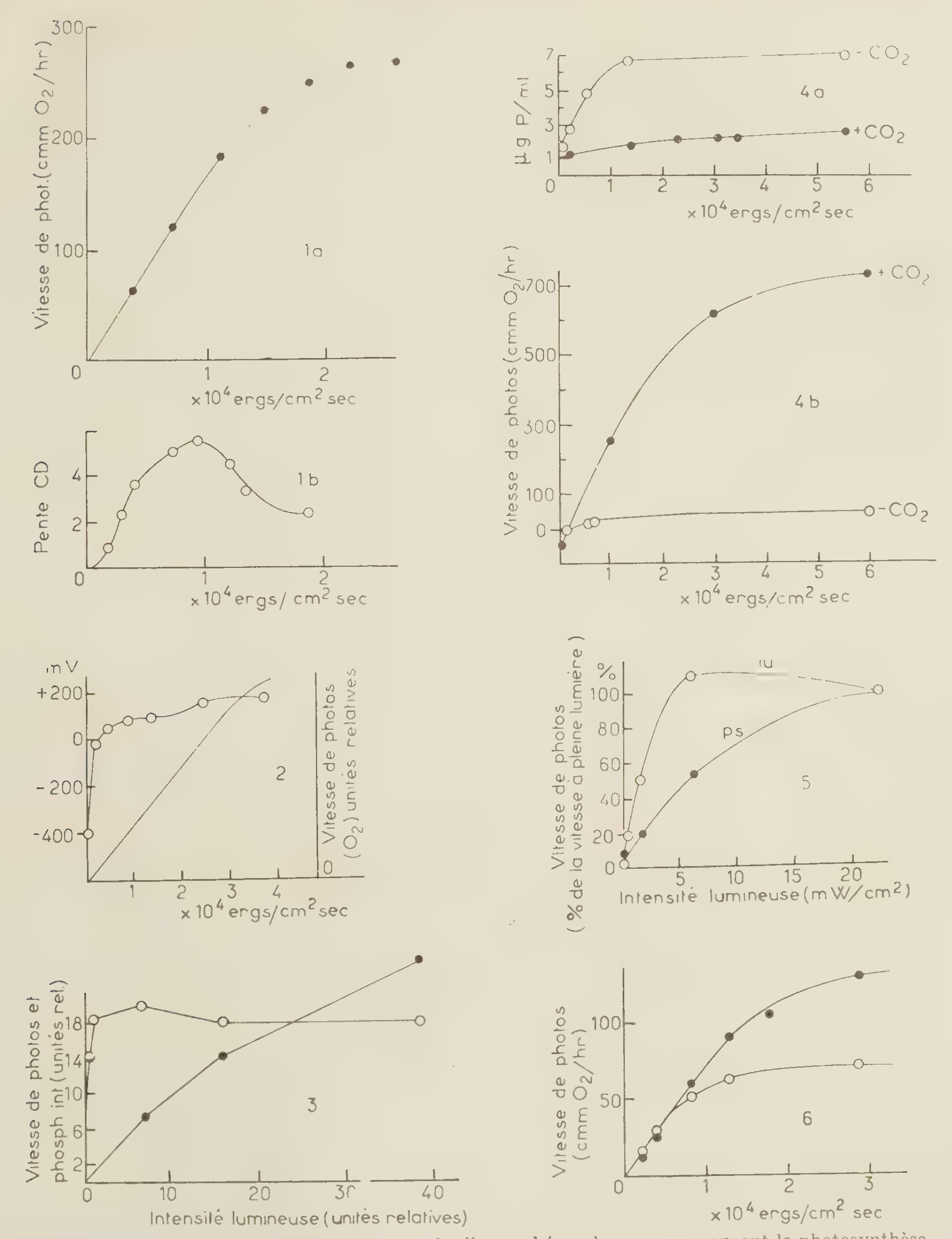


Fig. 7. — Dépendance de l'intensité lumineuse de divers phénomènes accompagnant la photosynthèse.

1 *a*. Photosynthèse stationnaire de Chlorella.

1 *b*. « Pente CD », accroissement secondaire de la courbe de fluorescence en fonction du temps en présence de cyanure en excès dans Chlorella. Cultures d'âge comparable (Données provenant de plusieurs expériences, réf. 29).

2. (Cercles) Potentiels d'oxydo-réduction dans une suspension de Chlorella, avec CO_2, 22 mn après le départ de l'irradiation; (ligne) échange gazeux stationnaire (d'après la réf. 33).

3. (Cercles) Luminescence retardée, Chlorella; (points) photosynthèse (d'après la réf. 50).

4 *a*. Absorption de phosphate à la lumière dans Chlorella en présence et en l'absence de CO_2; 4 *b*. vitesse de photosynthèse, *idem* (d'après réf. 63).

5. « Absorption initiale » de CO_2 (IU) et photosynthèse stationnaire (PS) (d'après réf. 64).

6. Photosynthèse des diatomées. (Cercles :) 5 s/mn irradiation, mesure manométrique cumulée, (points :) photosynthèse stationnaire (d'après réf. 65).

BIBLIOGRAPHIE

(1) O. Warburg, E. Negelein. — *Z.f. physikal Chemie*, 1923, **106**, 191-216.
(2) H. Fischer et H. Orth. — *Die Chemie des Pyrrols* II, 2, Leipzig, 1940.
(3) C. B. van Niel, dans J. Franck et W. E. Loomis. — *Photosynthesis in plants*, Ames, Iowa, 1949, p. 437-496.
(4) E. C. Wassink, E. Katz et R. Dorrestein. — *Enzymol.*, 1942, **10**, 285-354.
(5) E. C. Wassink. — *Enzymol.*, 1948, **12**, 362-372.
(6) H. Gaffron et K. Wohl. — *Naturwiss.*, 1936, **24**, 81-90, 103-107.
(7) H. J. Dutton, W. M. Manning et B. M. Duggar. — *J. Phys. Chem.*, 1943, **47**, 308-313.
(8) E. C. Wassink et J. A. H. Kersten. — *Enzymol.*, 1946, **12**, 3-32.
(9) C. S. French et V. K. Young. — *J. Gen. Physiol.*, 1952, **35**, 873-890.
(10) L. N. M. Duysens. — *Transfer of excitation energy in photosynthesis, Thèse*, Utrecht, 1952, p. 1-96.
(11) T. Förster. — *Z. Naturf.*, 1947, **2 b**, 174-182.
(12) E. I. Rabinowitch. — *Photosynthesis*, New-York, 1945, I; 1951, II, 1; 1956, II, 2.
(13) E. I. Rabinowitch. — *La photosynthèse*, Paris, 1958.
(14) P. F. Elbers, K. Minnaerts et J. B. Thomas. — *Acta botanica neerl.*, 1957, **6**, 345-350.
(15) E. Katz et E. C. Wassink. — *Enzymol.*, 1939, **7**, 97-112.
(15*a*) C. S. French. — *Science*, 1938, **88**, 60.
(16) E. L. Smith. — *J. Gen. Physiol.*, **24**, 565-582; 583-596; avec E. G. Pickels, *ibid.*, 1941, 753-764.
(17) E. C. Wassink, E. Katz et R. Dorrestein. — *Enzymol.*, 1939, **7**, 113-129.
(17*a*) E. E. Jacobs et A. S. Holt. — *J. Chem. Physics.*, 1952, **20**, 1326.
(18) C. Oh Eocha. — Rapport privé, août 1956, jusqu'à présent non publié.
(19) S. Brody. — *Nation. Biophys. Conf.*, Colombus, Ohio, March, 4-6, 1957. *Abstracts*, p. 15-16.
(20) E. I. Rabinowitch. — *Nation. Biophys. Conf. Colombus*, Ohio, March 4-6, 1957, *Abstracts*, p. 57-58.
(21) L. R. Blinks. — Dans: *Autographic Microorganisms*. Cambridge, 1954, p. 224-246.
(22) B. Kok. — *Acta botan. neerl.*, 1957, **6**, 316-336.
(23) L. N. M. Duysens. — *Science*, 1955, **121**, 210-211.
(24) J. M. Olson, B. Chance. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **28**, 227-228.
(25) J. M. Olson et B. Kok. — Sous presse.
(26) E. C. Wassink. — *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, 1947, **12**, 281-293.
(27) E. C. Wassink. — 4th *Internat. Congres Microbiol. Congres, Proceedings*, Copenhagen, 1949, p. 455-456.
(28) H. T. Witt, R. Moraw et A. Müller. — *Z. f. physikal. Chemie*, 1958, N. F. **14**, 127-129.
(29) E. C. Wassink et E. Katz. — *Enzymol.*, 1939, **6**, 145-172.
(30) J. W. Coleman, A. S. Holt et E. I. Rabinowitch. — *Science*, 1956, **123**, 795.
(30*a*) J. Franck dans: *Research in Photosynthesis*, Ed. H. Gaffron et al., (Gatlinburg conférence 1955), New-York, 1957, pp. 142-146.
(31) E. C. Wassink. — *Adv. in Enzymol.*, 1951, **11**, 91-199.
(32) E. C. Wassink et C. J. P. Spruit. — *8e Congrès intern. de botanique*, Paris, 1954, Sect. 11-12, 3-8.
(33) C. J. P. Spruit. — *Acta botan. neerl.*, 1952, **1**, 551-579.
(34) E. C. Wassink, D. Vermeulen, G. H. Reman et E. Katz. — *Enzymol.*, 1938, **5**, 100-109.
(35) L. N. M. Duysens et G. Sweep. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **25**, 13-16.
(36) C. J. P. Spruit. — *Rec. Trav. chimiques Pays-Bas.*, 1956, **75**, 1097-1100.
(37) J. A. Bassham, A. A. Benson, L. D. Kay, A. Z. Harris, A. T. Wilson et M. Calvin. — *J. Amer. chem. Soc.*, 1954, **76**, 1760-1770.
(38) J. C. S. Wessels. — *Rec. Trav. chimiques Pays-Bas*, 1954, **73**, 529-536.
(39) F. R. Whatley, M. B. Allen et D. I. Arnon. — *Biochim. Biophys. Acta.*, 1955, **16**, 605-606.
(40) A. Szent-Györgyi. — *Science*, 1941, **93**, 609-611.
(41) M. Evans et J. Gergeley. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1949, **3**, 188-197.
(42) R. Dorrestein, E. C. Wassink et E. Katz. — *Enzymol.*, 1942, **10**, 255-372.
(43) E. Katz dans J. Franck et W. Loomis. — *Photosynthesis in plants*, Ames, Iowa, 1949, p. 287-292.
(43 *a*) C. J. P. Spruit. — *Proceedings 1st Intern. Photobiol. Congress*, Amsterdam, 1954, p. 323-327 (publié en 1956).
(44) W. Arnold et H. K. Sherwood. — *Proceed. Nation. Acad. Sciences* (U.S.A.), 1957, **43**, 105-114.
(45) M. Calvin. — *Nuclear Chicago Award Address*, Amer. Chem. Soc. Meeting, Miami Fl. April 8, 1957, (UCRL, paper N° 3848).
(46) B. L. Strehler. — Dans: *Rhythmic and synthetic Processes in growth*, Princeton, N.J., 1957, p. 171-199.
(47) M. Calvin. — « Communication privée », voir Arnold, réf. 44; voir aussi réf. 66.
(47*a*) R. Hill. — *Rapport 3e Congrès intern. d. Biochimie*, Bruxelles, 1955, 225-227 (publié en 1956).
(48) T. Bücher et J. Kaspers. — *Naturwiss.*, 1946, **33**, 93.
(49) B. Strehler et W. Arnold. — *J. Gen. Physiol.*, 1951, **34**, 809-820.
(50) W. Arnold — Dans: *The Luminescence of Biolog. Systems*, Ed. F. H. Johnson, Washington D. C., 1955, p. 47-50.
(51) W. Arnold et J. Thompson. — *J. Gen. Physiol.*, 1956, **39**, 311-318.
(52) B. L. Strehler et V. Lynch. — *Archives Biochem. Biophysics*, 1957, **70**, 527-546.
(53) D. I. Arnon. — *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1956, **7**, 325-351.
(54) E. C. Wassink, J. E. Tjia et J. F. G. M. Wintermans. — *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet.*, Amsterdam, 1949, **52**, 412-422.
(55) E. C. Wassink, J. F. G. M. Wintermans et J. E. Tjia. — *Proceed. Kon. Ned. Akad. v. Wet.*, Amsterdam, 1951, **C 54**, 41-52, 496-502.
(56) J. F. G. M. Wintermans et J. E. Tjia. — *Proceed. Kon. Ned. Akad. v. Wet.*, Amsterdam, 1952, **C 55**, 34-39.
(57) J. F. G. M. Wintermans. — *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet.*, Amsterdam, 1954, **C 57**, 574-583.
(57*a*) E. C. Wassink. — Dans: *Research in Photosynthesis*, Ed. H. Gaffron et al. (Gatlinburg Conference, 1955), New-York, 1957, 333-339.
(58) D. I. Arnon, M. B. Allen et F. R. Whatley. — *8e Congrès intern. de botanique*, Paris, 1954, sect. 11-12, p. 1-2; voir aussi *Nature*, 1954, **174**, 394-396.
(59) O. Kandler. — *Z. Naturforschg.*, 1950, **5 b**, 423-437.
(60) E. C. Wassink et J. Rombach. — *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet.* Amsterdam, 1954, **C 57**, 493-497.
(61) B. L. Strehler. — *Archives Biochem. Biophysics*, 1953, **43**, 67-79.
(62) W. Lindeman. — En préparation pour la 2e Conférence Intern. sur les emplois pacifiques de l'énergie atomique, Genève, 1958.
(63) J. Wintermans. — *Meded. Landbouwhogeschool*, Wageningen, Pays-Bas., 1955, **55**, 69-126.
(64) P. Massini. — *Acta botanica neerlandica*, 1957, **6**, 434-441.

(65) E. C. Wassink et J. A. H. Kersten. — *Enzymol.*, 1943-45, **11**, 282-312.

(65*a*) B. Kok. — *Enzymol.* 1948, **13**, 1-56.

(66) M. Calvin. — *Rapport 3e Congrès internat. de Biochimie*, Bruxelles, 1955, p. 211-225, (publié en 1956).

(67) L. H. J. Bongers. — *Meded Landbouwhogeschool*, Wageningen, Pays-Bas, 1956, **56**, (15), 1-52.

(68) E. C. Wassink. — *Proc. ist. Internat. Photobiol. Congres*, Amsterdam, 1954, p. 307-322 (publié en 1956).

(69) E. C. Wassink et L. E. AE. Wassink-van Lummel. — *Report, 13 th Intern. Hortic. Congress*, London, 1952, p. 969-981 (publié en 1953).

(70) J. Bensink. — *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wet.* Amsterdam, 1958, **C 61**, 89-100.

DISCUSSION

E. C. Wassink *(En réponse à une question de* Rabinowitch). — Si les résultats de Kok sur l'absence des variations à environ 480 et 520 mμ chez les algues bleues ou rouges sont confirmés, il est difficile de les attribuer à une modification essentielle des chlorophylles, importante pour la photosynthèse, à moins de faire des hypothèses supplémentaires.

Au cours des discussions précédentes de cette semaine, je me suis demandé si une solution possible ne consisterait pas à admettre que ces maxima représentent un exciton (ou un état excité) prenant naissance dans la chlorophylle et qui, chez les algues bleues ou rouges, serait immédiatement piégé par les phycobilines, de sorte que ces maximums n'apparaîtraient pas chez ces organismes.

REDUCTION PHOTOCHIMIQUE REVERSIBLE DE LA CHLOROPHYLLE ET DE SES ANALOGUES ET MÉCANISME DE LA PHOTOSENSIBILISATION

par A. A. KRASNOVSKY.

[*Institut de biochimie* A. N. BACH *de l'Académie des Sciences d'U.R.S.S.*]

Traduit de l'anglais par Mme J. CYROT.

SOMMAIRE

Nous avons découvert et étudié la réaction de réduction photochimique reversible de la chlorophylle, de ses analogues et dérivés. Dans cette réaction se forment des photoproduits actifs qui « emmagasinent » l'énergie des quanta lumineux.

Il a été prouvé que l'action photosensibilisatrice de la chlorophylle dans les processus de transfert photochimique d'électron (hydrogène) dans les solutions est basée sur son aptitude à donner une photoréduction reversible.

Le résultat du stade lumineux de la réaction de la chlorophylle avec une molécule donatrice d'électron, est la formation d'un pigment photoréduit. Ce pigment réagit dans un stade obscur subséquent avec la molécule d'un accepteur d'électron provoquant sa réduction. On utilise dans ces réactions l'acide ascorbique et d'autres composés comme donneurs d'électrons et comme accepteurs d'électrons, une grande variété de systèmes avec des valeurs de E_0 allant jusqu'à — 0,35 V (à pH 7).

L'étude des réactions photochimiques de la chlorophylle, à l'état naturel de liaison dans les homogénats de feuilles vertes, a montré la possibilité de telles réactions de transfert d'électron (hydrogène). La détermination du mécanisme de l'action photosensibilisatrice de la chlorophylle et de ses analogues permet de prouver expérimentalement les hypothèses émises au sujet de la participation de la chlorophylle aux processus de transfert photochimique d'électron dans les photosynthèses, au sujet du mécanisme élémentaire de l'action photodynamique de la porphyrine et de la participation possible des pigments de porphyrine aux différents processus photobiologiques dans les plantes.

Un des moyens pour comprendre l'étape photochimique de la photosynthèse est l'étude des changements des pigments de plantes sous l'influence de la lumière. Déjà au XIXe siècle des recherches avaient été faites dans ce domaine; ainsi, par exemple, Claude BERNARD, GAUTIER et TIMIRIASEV ont montré le rôle possible de changements par réduction reversible de la chlorophylle dans la photosynthèse. Le fait, découvert par nous (1), que la chlorophylle et des produits analogues peuvent subir une photoréduction reversible, est en rapport avec ce type de problèmes. Cette réaction est accompagnée de la formation de photo-produits actifs, « emmagasinant » l'énergie des quanta lumineux, réagissant de façon réversible après arrêt de l'irradiation, avec formation d'une molécule du pigment initial. Nos recherches ont montré que l'action photo-sensibilisatrice de la chlorophylle en solution est basée sur l'aptitude des pigments à photo-réduction reversible et il est à présumer qu'elle est en relation avec la participation de pigments de cette classe dans les processus photobiologiques.

Dans les travaux que nous décrivons ci-dessous, nous avons fait une étude comparative des propriétés de la chlorophylle, de produits analogues et de dérivés, qui permet de se rendre compte de l'influence de diverses substitutions dans une molécule de pigment, comme aussi de la nature de l'atome central métallique, sur les propriétés photochimiques. Nous avons étudié des pigments dérivés de différents organismes et purifiés par chromatographie, aussi bien que des pigments sous forme de composés protéiniques naturels en respectant leurs structures biologiques (suspension de granules).

Nous avons étudié la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* des plantes vertes, la bactériochlorophylle des bactéries photosynthétiques, la protochlorophylle de feuilles fanées et de graines de citrouille, certaines phéophytines, diverses porphyrines, phtalocyanines et phycobilines d'algues.

Le présent mémoire passe rapidement en revue nos recherches; nous ne pouvons donner ici une bibliographie détaillée des travaux effectués dans ce domaine, ni décrire en détail les techniques des expériences. Nous avons utilisé surtout des méthodes spectrales en particulier la spectrophotométrie photoélectrique dans des tubes à vide.

I. — Étude de la réaction de photoréduction réversible.

Mesures spectrophotométriques. — Une illumination de courte durée, par de la lumière rouge

(en l'absence d'air), de solutions dans la pyridine de chlorophylle et de produits analogues avec de l'acide ascorbique provoque la formation de produits de photoréduction de couleur différente

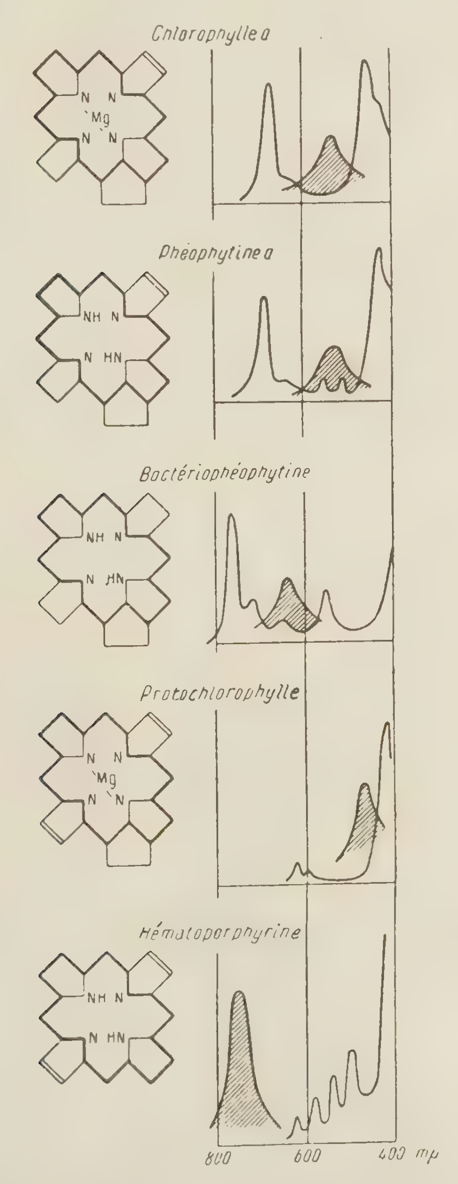


Fig. 1. — Représentation schématique de la structure et des spectres d'absorption des pigments (dans la pyridine avec de l'acide ascorbique) avant réaction, après photoréduction et après réaction inverse dans l'obscurité. Les spectres d'absorption des formes photoréduites de pigment sont ombrés (1).

de celle du pigment initial. Ainsi, la chlorophylle *a* et la phéophytine *a* donnent un photoproduit présentant un maximum pour 523 mμ (1, 2), la protochlorophylle pour 470 mμ (3), la bactériophéophytine pour 640 mμ (4), etc.

Après cessation de l'irradiation, la réaction s'inverse avec retour au spectre d'absorption du pigment initial, processus qui se produit plus rapidement lorsqu'on ajoute des oxydants. Nous avons remarqué que, contrairement à ce qui se passe pour la chlorophylle, la photoréduction de porphyrines conduit à la formation de produits absorbant dans la région spectrale de plus grande longueur d'onde. Ainsi, l'hématoporphyrine donne des produits, ayant un maximum d'absorption pour 650 et 740 mμ (5), qui se trouvent en relation d'équilibre acido-basique.

Les produits de la photoréduction présentent de la fluorescence — la chlorophylle dans la région de 550-650 mμ, la protochlorophylle à 500 mμ environ et l'hématoporphyrine à 760 mμ environ.

Mesures à basses températures. — Evstigneev et Gavrilova (6) ont montré que la vitesse de la réaction de l'acide ascorbique avec la chlorophylle est fortement réduite à — 40°, tandis que la phéophytine donne un photoproduit nouveau brun ayant un spectre différent de celui du composé réduit rouge, qui se forme à la température ambiante. Par chauffage, ce produit primaire se transforme en un composé rouge. Des résultats semblables

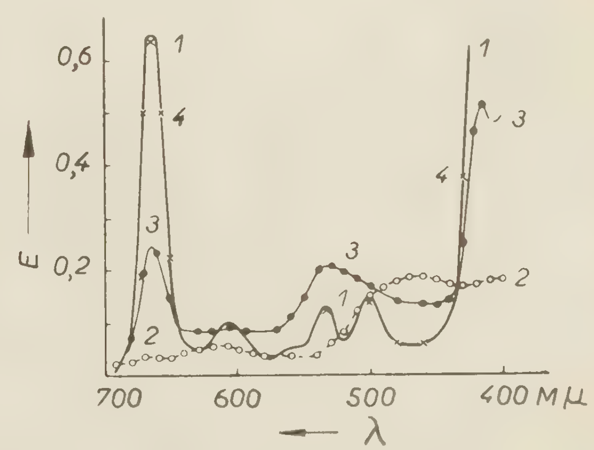


Fig. 2. — Photoréduction de la phéophytine *a* (6).
1. — Spectre d'absorption initial;
2. — après irradiation à — 40°;
3. — à + 20°;
4. — après réaction inverse dans l'obscurité.

ont été obtenus dans le cas de la protéophéophityne et de l'hématoporphyrine. Dans le cas de la phtalocyanine de magnésium la réaction est rapidement reversible à la température ambiante, mais à — 70° on peut mesurer le spectre d'un photoproduit qui est la forme « secondaire » réduite (7) semblable à la

forme « rouge » de la chlorophylle. Il a été impossible jusqu'à présent de mesurer le spectre de la forme photoréduite primaire de la chlorophylle (semblable à la « forme brune » de la phéophytine) en raison de la rapide reversibilité de l'acte primaire de fixation d'un électron par les complexes pigments-magnésium même à basse température.

Variation du potentiel d'oxydo-réduction (E'_0) *dans une photoréaction.* — Dans le travail que nous avons effectué avec Brin [8], nous avons utilisé la méthode des indicateurs d'oxydo-réduction pour suivre la variation de E_0 d'un système après réaction à la lumière. On effectuait une photoréaction de la chlorophylle avec l'acide ascorbique dans un tube à vide de Thunberg muni d'une tubulure latérale, puis on ajoutait dans l'obscurité, aux produits de la photoréduction, des solutions de composés à E'_0 de valeurs diverses et on observait au spectrophotomètre la vitesse de la réaction inverse.

Tandis que le système chlorophylle-acide ascorbique est capable de réduire (dans la pyridine) des systèmes dont le E_0 va jusqu'à 0,05 V (bleu de méthylène), on observait après irradiation une réduction de systèmes dont le E_0 allait jusqu'à — 0,35 V (Safranine T, pyridine-nucléotides). Ces données ont été confirmées par des mesures du potentiel d'une électrode inerte dans le système réactionnel. Nous avons observé une variation rapide du potentiel

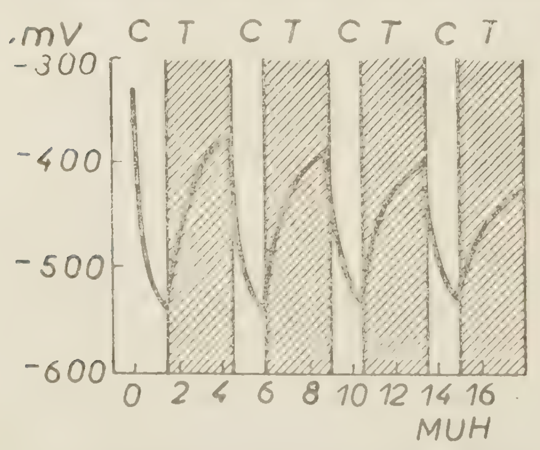


Fig. 3. — Modification du potentiel d'électrode du platine dans une solution de chlorophylle dans la pyridine avec de l'acide ascorbique [10] pour des périodes alternées de lumière (C) et d'obscurité (T).

d'une telle électrode par irradiation du système chlorophylle-acide ascorbique [8], en accord avec les expériences de Rabinowitch [9] avec le système thionine-ion ferreux. Evstigneev et Gavrilova ont fait une étude détaillée du photopotentiel d'une électrode de platine par irradiation d'une solution réagissante [10]. Des expériences spéciales ont montré que ce n'est pas l'irradiation de l'électrode qui détermine les photopotentiels, mais la formation de photoproduits au sein de la solution. A basse température on a observé un déplacement plus prononcé des valeurs de E_0 dû à une diminution de la vitesse de la réaction inverse, avec accroissement de la concentration stationnaire du photoproduit.

On a observé une variation de E_0 à — 70° (c'est-à-dire dans des conditions où il n'y a pas formation de la forme « rouge » de la chlorophylle); ce fait donne à penser que le potentiel est déterminé par la formation de la forme primaire réduite, active sur l'électrode et réagissant rapidement de façon reversible, de la chlorophylle et de ses analogues, étudiée par Evstigneev [11]. Par irradiation de solutions de chlorophylle et de produits analogues avec de l'acide ascorbique, la valeur ΔE_0 se déplace du côté négatif pour atteindre — 0,35 V, ce qui concorde bien avec les expériences faites avec les indicateurs d'oxydo-réduction [3]. Ainsi, la forme primaire réduite active sur l'électrode et les formes « rouges » ont des valeurs de E_0 voisines.

Par irradiation dans le vide du système réactionnel, on a observé une augmentation de la conductivité électrique [12]; lorsque l'irradiation cessait, on retrouvait la valeur initiale de la conductivité électrique, ce qui prouvait la formation d'un photo-

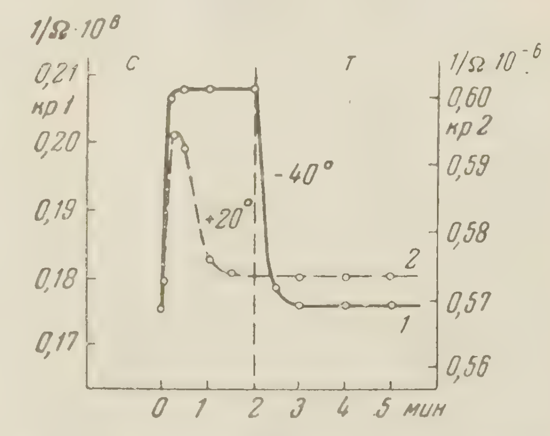


Fig. 4. — Photoconductivité d'une solution de chlorophylle $a + b$ dans de la pyridine avec la phénylhydrazine [12].

produit ionique. Une comparaison qualitative de la cinétique de la photoconductivité avec l'apparition du photopotentiel à différentes températures montre que ce sont bien les produits actifs sur l'électrode qui régissent l'apparition de la photoconductivité. Ainsi, dans le cas de la phéophytine à — 40°, la photoconductivité et le photopentiel se maintiennent après que l'irradiation a cessé, tandis qu'à + 20° on observe une rapide reversibilité des effets dans l'obscurité.

Agents de réduction moléculaires (donneurs d'électrons), réagissant avec la chlorophylle et ses analogues. — Une réaction distincte, avec formation de produits de longue durée de vie, a été observée dans la pyridine lorsqu'on utilisait de l'acide ascorbique et autres diénols, de la phénylhydrazine, de l'hydrogène sulfuré et de la cystéine [1,2]. Pour étudier la formation « cachée » rapidement reversible de photoproduits primaires, il a été nécessaire de recourir à des méthodes permettant d'observer la formation de ces composés pendant la période d'irradiation; celles qui convenaient le mieux dans ce cas étaient les mesures de photopotentiel, la photopolymérisation sensibilisée ou la réduction sensibilisée d'accepteurs d'électrons, réduisant de façon irreversible.

L'hydroquinone, le pyrocatéchol, la thiosinamine et d'autres composés présentaient des variations de E'_0 vers les valeurs négatives par réaction avec la chlorophylle [11]. La méthode de polymérisation [13] a révélé que l'activité des composés ferreux pouvait être due à la réaction reversible :

$$Chl + Fe^{++} \rightleftharpoons .Chl^- + Fe^{+++};$$

l'oxydation sensibilisée du cytochrome *c* en présence de chlorophylle que nous avons observée [14] témoigne de la possibilité d'un processus reversible également dans ce cas. Ainsi, une molécule excitée de chlorophylle est en mesure de capter un électron aux systèmes ayant des E'_0 allant de — 0,05 à 0,3 V. Il est probable que la chlorophylle réagit facilement avec le cytochrome-*b*, trouvé dans les chloroplastes par HILL [15]; la valeur de E'_0 pour ce cytochrome est voisine de celle de l'acide ascorbique. Cependant la question de savoir si une molécule excitée de pigment peut capter un électron à une molécule d'eau n'est pas encore élucidée jusqu'à présent.

Emploi de donneurs deutérés. — Nous avons trouvé [16] que l'emploi d'acide ascorbique deuteré entraîne un retard de la photoréduction de la chlorophylle qui conduit à la formation de la « forme rouge »; la réaction obscure inverse est en même temps ralentie. (La réaction de HILL est également retardée lorsque la quantité de D_2O dans H_2O s'accroît.) En continuant ces recherches, EVSTIGNEEV et GAVRILOVA [17] ont trouvé que D_2O, bien que ralentissant la formation de la forme « rouge » de la phéophytine, n'affectait pas la vitesse de formation de la forme primaire photoréduite. C'est une autre preuve de la transition d'un électron pendant la formation de la forme « primaire » réduite et de la participation du proton à la formation de la forme « rouge » plus stable.

Réaction avec solvant. — PORRET et RABINOWITCH [18] ont été les premiers à découvrir les effets de la décoloration reversible de la chlorophylle. LIVINGSTON [19] a étudié la décoloration par spectroscopie par éclair et trouvé une augmentation d'absorption par 525 mμ qui correspond au maximum de la forme photoréduite de la chlorophylle. LINSHITZ et RENNERT [20] ont découvert des modifications reversibles du spectre d'absorption de la chlorophylle, en l'éclairant dans un milieu rigide à basse température.

On pourrait penser que ces effets s'expliquent par une photoréduction reversible de la chlorophylle pour laquelle les molécules de solvant agiraient comme donneurs d'électron; en fait, l'oxygène empêche les effets de reversibilité [18], tandis que le « spectre de l'état de triplet », dans les travaux de LIVINGSTON, ressemble au spectre de la forme photoréduite de la phéophytine mesuré par EVSTIGNEEV [6].

Effets des propriétés acide-base du milieu. — Il est possible d'observer dans la pyridine une formation prononcée des formes stables de la chlorophylle. Nous avons déjà suggéré [1] que cette stabilité est en relation avec les conditions d'équilibre acide-base, lorsqu'un proton est lié « entre » une molécule de pigment qui a fixé un électron et une molécule du milieu c'est-à-dire la base :

$$.Chl^- \ldots H^+ \ldots N\lessdot$$

Ces composés relativement stables ne sont possibles que lorsqu'on maintient certaines valeurs de l'affinité protonique d'une molécule de pigment et le milieu basique. La basicité optimum du milieu, à laquelle se forment les formes stables réduites, diffère selon les pigments. On pourrait s'attendre à ce que, dans un milieu plus basique que la pyridine, la formation d'ions radicaux chargés négativement ($.Chl^-$), donnant rapidement une réaction inverse, soit prédominante,

$$.Chl^- \ldots H^+ \ldots N\lessdot + N'\lessdot \rightarrow .Chl^- + H^+N'\lessdot + N\lessdot$$

Dans les milieux plus « acides », on peut s'attendre à la formation d'ions-radicaux chargés positivement par fixation respective d'un proton (.ChlH) et deux protons ($.ChlH^+_2$).

En fait nos expériences avec PAKSHINA ont montré que, si l'on ajoute quelques gouttes d'une base forte — pipéridine ou ammoniaque — à une solution pyridinique de la forme « rouge », il se produit rapidement une réaction inverse (due à l'ionisation de la forme réduite); en accord avec ce résultat l'addition de pipéridine ou d'ammoniaque à une solution pyridinique de chlorophylle empêche la formation de la forme « rouge ». Ces expériences doivent être faites rapidement et de préférence à basse température, parce qu'il suffit de 1 % de pipéridine dans la pyridine pour obtenir une coupure graduelle de l'anneau

de cyclopentanone d'une molécule de pigment. Nos expériences avec Brin ont montré que, si la réaction est faite dans la pyridine, séchée complètement par l'hydrure de lithium, la formation de la forme « rouge »

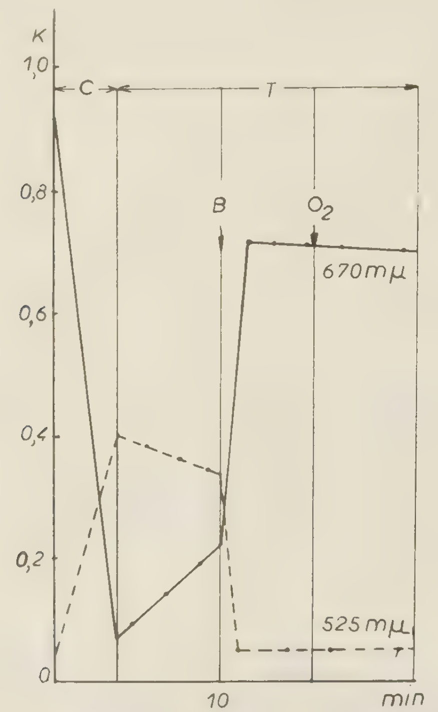


Fig. 5. — Influence des bases fortes sur la vitesse de la réaction inverse de formation de chlorophylle *a* à partir de sa forme photoréduite :
B. — introduction d'une base forte;
C. — lumière;
T. — obscurité.

se produit beaucoup plus lentement que dans la pyridine humide ordinaire, fait qui s'explique par le manque de la pyridine sèche en ions hydrogène nécessaires pour produire la forme « rouge ».

Dans le cas de l'hématoporphyrine dans des milieux fortement basiques (pipéridine), il se produit une forme réduite avec absorption maximum pour 650 mμ, tandis que, dans les solutions plus « acides » (mélanges d'éthanol et pyridine), le maximum est à 740 mμ. Par variation du pH d'un milieu, il est possible de modifier plusieurs fois et de façon réversible la position du maximum d'absorption des formes réduites. Ainsi, la transformation de la forme « 650 » en la forme « 740 » est déterminée non pas par des degrés différents d'oxydo-réduction, comme nous le supposions auparavant ([5]), mais par les conditions d'équilibre acide-base. Il faut remarquer, que lors de la réduction des pigments par le zinc, on observe une acidité optimum pour la formation des formes réduites des différents pigments ([21]).

Ainsi, nous voyons que les propriétés spectrales et l'aptitude à réagir des formes photoréduites de pigments changent énormément selon la basicité du solvant.

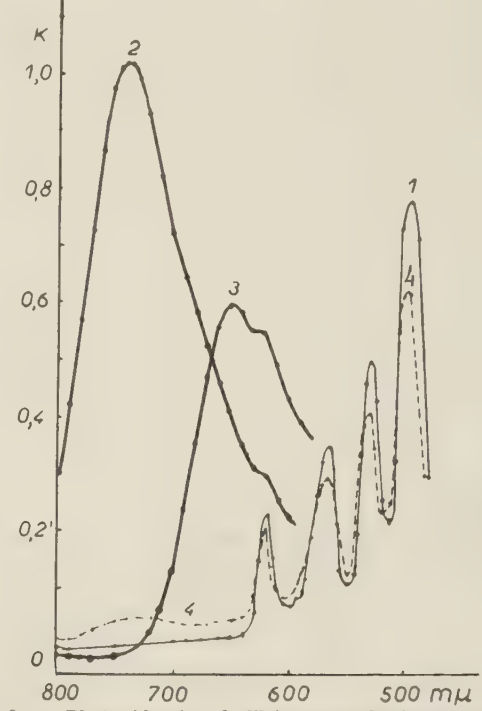


Fig. 6. — Photoréduction de l'hématoporphyrine par l'acide ascorbique dans une solution éthanol-pyridine :
1. spectre d'absorption initial;
2. après éclairage;
3. introduction de quelques gouttes de pipéridine ou d'ammoniaque à — 40°;
4. après réaction inverse dans l'obscurité.

Formation de radicaux libres dans une réaction de photoréduction. — Les molécules oxydantes (quinones, composés nitrés) éteignent la fluorescence de la chlorophylle, mais ne réagissent pas photochimiquement avec la chlorophylle, tandis que les réducteurs, en réagissant avec la chlorophylle, ne produisent pas un effet d'extinction « physique » sur la fluorescence des pigments ([22]). Ces observations prouvent la possibilité de la participation des molécules métastables de pigment à la réaction. Ces molécules sont probablement à l'état de triplet ou de biradical, conformément aux idées de Terenin, J. N. Lewis et Kasha, maintenant largement répandues.

Dans un acte élémentaire de photoréduction une molécule excitée de chlorophylle reçoit un électron d'une molécule donatrice avec formation d'une paire ion-radical; l'acte suivant de transfert protonique conduit à la formation de radicaux sous

forme non-ionique :

$$\mathrm{Chl} + \mathrm{AH} \rightleftharpoons .\mathrm{Chl}^- + .\mathrm{AH}^+ \rightarrow .\mathrm{ChlH} + .\mathrm{A}$$

Uri [23] a trouvé que, en présence d'acide ascorbique, la chlorophylle initie la polymérisation du métacrylate de méthyle. Dans nos travaux avec Umrichina [13], nous avons fait une étude de la photopolymérisation initiée par un système pigment-donateur d'hydrogène dans des solutions de pyridine et des émulsions aqueuses. Cette étude a prouvé que la polymérisation est initiée par la chlorophylle, tous ses analogues et dérivés. Les phycobilines n'affectent pas la polymérisation, ce qui est en accord avec leur inaptitude à la photoréduction. Les diénols, la cystéine, les composés ferreux étaient les donateurs d'électron les plus actifs. (A ce propos nous n'avons pas pu détecter la réaction de Fe^{++} avec la chlorophylle par d'autres méthodes.) Les composés (safranine, riboflavine), réagissant activement sur les formes photoréduites des pigments, empêchaient la polymérisation. Nous sommes arrivés à la conclusion que, dans des conditions d'anaréobie, la polymérisation est initiée par une forme réduite ion-radical du pigment, et, dans des conditions d'aérobie, par les radicaux issus de la réduction photosensibilisée de l'oxygène (OH, HO_2). Il faut noter, au sujet de l'hypothèse de Rosenberg [24] relative à l'influence possible de l'état de triplet du pigment dans ces expériences, qu'on n'a observé de polymérisation active qu'en présence de molécules donatrices d'électron (y compris les molécules de solvant). Linshitz et Weissman [25] n'ont pas réussi à trouver de résonance paramagnétique de la forme réduite « rouge » de la chlorophylle et on ne sait pas encore exactement à l'heure actuelle si cette forme est un radical (.ChlH) ou un produit à valence saturée ($ChlH_2$). On peut difficilement mettre en doute, cependant, que l'effet primaire d'une formation de paire ion-radical puisse être trouvé en utilisant des mesures de résonance paramagnétique au cours de l'irradiation d'un système pigment-acide ascorbique, à condition que l'installation ait une sensibilité appropriée.

Structure du pigment et son aptitude à photoréduction. — On a observé une réaction avec tous les dérivés de la chlorophylle et analogues, ayant la structure de la porphyrine, de la chlorine et de la bactériochlorine avec des atomes centraux d'hydrogène, de magnésium ou de zinc. Dain et ses collaborateurs [26] ont observé la possibilité d'une photoréduction lente des complexes ferriques de la porphyrine [18]. Les propriétés spectrales et la réactivité des formes réduites sont différentes suivant les pigments et les solvants. En général les complexes du magnésium donnent des formes réduites plus actives (réagissant rapidement de façon reversible) que les phéophytines-complexes sans magnésium. Les comparaisons de la capacité de réaction avec des pigments possédant des structures différentes indiquent que la caractéristique principale est la présence d'un système de doubles liaisons circulaires conjuguées dans une molécule de pigment.

Mécanisme de photoréduction. — Nous avons mentionné plus haut la possibilité que la transition d'une molécule excitée de chlorophylle à l'état de triplet de longue durée soit le stade primaire « photophysique ». Il est peu probable qu'il se forme des complexes intermédiaires stables de molécules donatrices d'hydrogène avec une molécule de pigment dans une solution de pyridine, parce que les molécules de la base forment des complexes stables qui se lient avec l'atome central de magnésium d'une molécule de pigment [27]. La formation d'associations de pigment à l'état de triplet avec une molécule donatrice est beaucoup plus probable [1]. A l'état excité une molécule de pigment présente une affinité accrue (puisqu'il y a un « trou » dans un système de doubles liaisons conjuguées) pour un électron et fixe facilement un électron d'une molécule donatrice. Nous avons déjà suggéré qu'un électron non apparié dans un ion-radical ainsi formé est déplacé dans un système de doubles liaisons conjuguées [1] tandis que l'acte obscur subséquent de l'addition d'un proton semble être en relation avec la localisation de la rupture de conjugaison à une certaine place qu'on n'a pas encore découverte.

Le transfert protonique est en relation avec l'établissement d'un nouvel équilibre acide-base après photoréaction. On ne sait pas encore clairement s'il se produit une disproportion des radicaux ni si la forme « rouge » est un leuco-dérivé du type ($ChlH_2$) ou un radical (ChlH), ce qui nous semble plus probable. Le premier stade d'une photoréaction — le transfert d'électron — est complètement reversible dans l'obscurité; après addition d'un proton, la réaction inverse conduit ordinairement à une régénération incomplète du pigment. Nous proposons donc le schéma de réaction suivant :

Stade photophysique :

$$\mathrm{Chl} + h\nu \rightarrow \mathrm{Chl}^* \rightarrow .\mathrm{Chl}.$$

Stade photochimique :

$$.\mathrm{Chl}. + \mathrm{AH} \rightleftharpoons .\mathrm{Chl}.\mathrm{AH}$$

$$\rightleftharpoons .\mathrm{Chl}^- + \mathrm{AH}^+ \rightarrow .\mathrm{ChlH} + .\mathrm{A}$$

II. — Réacti[...] d'oxydo-réduction photose[...] bilisées par l[...] [...]hlorophylle.

En irradiant a[...]ec de la lumière rouge (e[...] d'air) un système chlorophylle-donate[...]

accepteur d'électron, on observe une réduction sensibilisée des accepteurs d'électron aux dépens des quanta de lumière absorbés par la chlorophylle. Tous les produits analogues à la chlorophylle capables de photoréduction possèdent une activité photosensibilisatrice ([28, 29]). Dans les cas de la bactériochlorophylle et de la bactériophéophytine, les réactions sont excitées par la lumière de la région du proche infrarouge. Dans les tubes à vide de Thunberg on étudie commodément ces réactions par voie spectrophotométrique en observant la variation de densité optique aux maxima d'absorption de l'accepteur ou l'apparition de nouveaux maxima des composés réduits.

En utilisant de l'acide ascorbique ($E_0 = + 0{,}05$ V) comme donneur d'électron, nous avons observé la photoréduction de la riboflavine ($E_0 = — 0{,}22$ V), de la safranine-T ($E_0 = — 0{,}3$ V) ([28]), des pyridine-nucléotides ($E'_0 = — 0{,}32$ V ([29]). Lorsque la lumière est éteinte, les réactions s'inversent à des vitesses

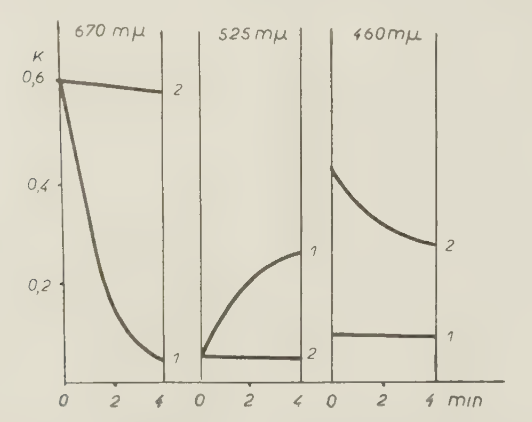


Fig. 7. — Photoréduction, photosensibilisée par la chlorophylle, de la riboflavine par l'acide ascorbique dans la pyridine (dans le vide).
1. système chlorophylle-acide ascorbique;
2. chlorophylle-acide ascorbique-riboflavine. Modification de la densité optique par éclairage en lumière rouge.
Chlorophylle (670 mμ), forme photoréduite de la chlorophylle (520 mμ) riboflavine (460 mμ).

différentes, exigeant parfois l'introduction d'oxygène pour la régénération du colorant à partir de la forme leuco. Ces réactions sont accompagnées, par « stockage » d'énergie lumineuse, d'un accroissement de l'énergie libre du système, caractérisé par une différence dans les valeurs E'_0 du donneur (+ 0,05 V) et de l'accepteur d'électron (— 0,32 V), que l'on peut ossièrement estimer à :

$$\Delta F = 2 . 23{,}06 \ 0{,}4 \doteq 18{,}4 \text{ kcal.}$$

...teur comparative de la réaction inverse ...ocessus que nous avons étudiés, pourrait ...ar la dismutation rapide des semiquinones initialement formées en leuco-composés plus stables; par irradiation la vitesse de dismutation est plus grande que celle des réactions inverses des photoproduits primaires. Nous avons réussi à observer dans des milieux aqueux une oxydo-réduction du cytochrome sensibilisée par la chlorophylle *a* ([14]). Dans cette réaction les protéines (ou l'eau?) pouvaient servir de donneur d'électron, tandis que la photoxydation du cytochrome réduit s'effectuait en présence de l'oxygène de l'air.

Dans un certain nombre de réactions sensibilisées, effectuées dans des conditions d'aérobie, l'oxygène est l'accepteur d'électron final.

L'oxydation d'un certain nombre de composés organiques, sensibilisée par la chlorophylle, est connue depuis longtemps, mais, jusqu'à présent, l'unanimité ne s'est pas faite en ce qui concerne le mécanisme de ce processus. Dans nos expériences avec Brin, nous avons observé, au moyen de la technique manométrique de Warburg, la photoxydation d'un certain nombre de donneurs d'hydrogène, capables de photoréduction de la chlorophylle et de la phéophytine ([30]). Il est possible que le stade obscur de la réaction se limite à la régénération par l'oxygène de la chlorophylle à partir de sa forme photoréduite. L'autre mécanisme est moins probable d'une formation primaire de peroxyde de chlorophylle avec pour acte obscur la réduction de ce peroxyde par un donneur d'hydrogène, bien que nous ayons observé des produits instables de photoxydation de la chlorophylle et de la bactériochlorophylle, réagissant (lentement) sur l'acide ascorbique avec régénération du pigment ([4, 31]). Il se peut qu'une photoréaction de la chlorophylle avec un donneur

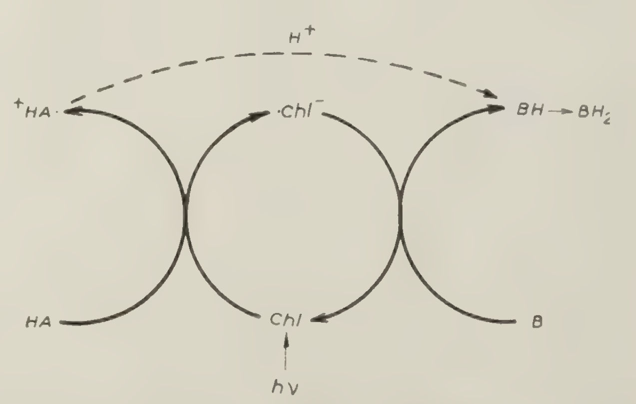


Fig. 8. — Schéma du mécanisme de l'action photosensibilisatrice de la chlorophylle.
transfert d'électron
---- transfert de proton.

d'hydrogène se produise beaucoup plus rapidement qu'une photoréaction avec de l'oxygène.

Les faits suivants prouvent que les réactions

sensibilisées étudiées passent par le stade d'une photoréduction reversible pigment-sensibilisateur.

1) On observe une photoréduction sensibilisée dans un système contenant des donneurs d'hydrogène, prêts à participer à une photoréduction de la chlorophylle observable spectrophotométriquement, électrométriquement ou autrement.

2) Dans un système triple, contenant un donneur d'électron, un pigment et un accepteur d'électron, on ne peut pas observer l'accumulation de la forme photoréduite du pigment, en raison de la réaction rapide de cette forme avec les molécules d'accepteurs. Les produits de la photoréduction des pigments commencent à s'accumuler quand toutes les molécules de l'accepteur sont réduites; cela est illustré nettement ([32]) par des essais effectués à basse température avec de la phéophytine.

3) Pour finir nous avons séparé expérimentalement le stade photochimique de la réaction (formation des formes photoréduites de pigments) et le stade obscur de la réaction (interaction des pigments photoréduits avec les molécules d'accepteurs d'électron) ([8]). Ces réactions se produisent plus rapidement avec les formes photoréduites « primaires » des pigments, dont on n'observe l'accumulation qu'avec les phéophytines ([32, 10]).

Les résultats expérimentaux dont nous disposons conduisent donc à la conclusion que les réactions sensibilisées procèdent par une photoréduction reversible de la chlorophylle.

Alors qu'un tel mécanisme de réaction est mis en évidence par des expériences directes en solutions, il est difficile de séparer dans le cas de la sensibilisation hétérogène par des pigments à l'état colloïdal ou cristallin, certains stades de réaction, se déroulant aux séparations de phases. On peut s'attendre à des actes élémentaires de transfert d'un électron d'un accepteur à une molécule de pigment (« trou ») à la séparation de phase et on peut retenir aussi l'acte compensateur de transition d'un électron à une molécule d'accepteur. Cette possibilité a été montrée dans les expériences d'Evstigneev et Terenin ([33]), qui ont mesuré le photopotentiel de films solides de pigments dans des milieux aqueux.

III. — État de la chlorophylle et ses propriétés photochimiques.

Jusqu'ici nous avons décrit les réactions d'une molécule de chlorophylle dans des solvants organiques; faisons maintenant une étude des propriétés de la chlorophylle sous forme d'agrégats en solutions colloïdales aqueuses. On sait depuis longtemps que l'on obtient des solutions colloïdales en versant des solutions de chlorophylle (dans l'éthanol, l'acétone, le dioxane et la pyridine) dans un excès d'eau ou de solutions tampons; nous avons trouvé qu'on peut aussi obtenir des solutions colloïdales de chlorophylle en dissolvant directement dans l'eau de la chlorophylle adsorbée sur du sucre par un procédé de chromatographie. Ces solutions colloïdales sont dépourvues de fluorescence (seules celles obtenues à partir de pyridine sont légèrement fluorescentes). La position du maximum d'absorption et la taille des particules dépendent du type du solvant et du pH du milieu aqueux; les études que nous avons faites avec Vorobyova ont montré qu'à pH 4-5 il se faisait des particules plus grandes avec maximum d'absorption à environ 690 mμ, tandis qu'à pH 8-9 il se formait des colloïdes assez stables avec absorption à 670-672 mμ. Nous n'avons pas réussi à observer une photoréduction en solutions colloïdales par spectrophotométrie; cela n'est pas surprenant, du fait que seules les molécules de chlorophylle, présentes à la séparation de phase entre une particule de colloïde et le solvant, peuvent subir une modification chimique. Le nombre de ces molécules est très petit comparativement au nombre total de molécules dans une particule colloïdale. Contrairement à ce qui se passe pour ces systèmes nous avons trouvé que les colloïdes, obtenus en versant des solutions de chlorophylle dans des solutions aqueuses de détergents (anionique, cationique et neutre), avaient une fluorescence très vive, un maximum d'absorption à 668-670 mμ et des propriétés photochimiques semblables à celles de la chlorophylle en solution ([30, 34]). Cela peut être dû au fait que les molécules de pigment sont placées ici sous forme de monocouche sur les micelles de détergent, donc pas sous forme d'agrégats.

Les solutions aqueuses de chlorophylle exercent un certain effet photosensibilisateur, plus notable dans les cas où les accepteurs finaux d'électron sont réduits de façon irreversible, ce qui se produit dans le cas de l'oxygène et des colorants azoïques.

A l'opposé de la faible activité de ces systèmes, les colloïdes obtenus au moyen de détergents exercent un fort effet sensibilisateur, qui n'est pas inférieur à celui de la chlorophylle en solution vraie. Il est donc presque certain que dans ce cas le mécanisme élémentaire du processus est le même.

Nous avons déjà remarqué en 1946 l'effet photocatalytique des phtalocyanines cristallisées qui serait du type photocatalyse par semiconducteur ([35]).

IV. — Chlorophylle in vivo, dans les granules des chloroplastes des feuilles vertes.

Jusqu'ici nous avons décrit des expériences avec de la chlorophylle en solution; nous passons à l'étude de la chlorophylle *in vivo*. Dans les plantes on peut

trouver la chlorophylle sous différents états, ayant des propriétés photochimiques et optiques différentes. Nous avons été amenés à cette conclusion à la suite des expériences suivantes.

1. *Étude de la formation de chlorophylle à partir de la protochlorophylle des feuilles.*

En étudiant les spectres d'absorption d'homogénats de feuilles fanées et de feuilles fraîches, VOROBYOVA et moi avons trouvé que la chlorophylle fraîchement formée avait un maximum d'absorption différent de celui des feuilles parvenues à leur développement et qui disparaissait rapidement par oxydation photochimique (destructive) en présence d'air. Dans le processus d'accumulation de chlorophylle, ce maximum se déplace à 678 mμ en s'accompagnant d'une augmentation de la stabilité du pigment vis-à-vis de l'action de la lumière ([36]). SMITH a également observé des différences dans les spectres d'absorption d'une chlorophylle fraîchement formée ([37]).

En collaboration avec LITVIN nous avons étudié les spectres de fluorescence de feuilles fanées et de feuilles vertes à — 150° (il faut de basses températures pour empêcher le processus de formation de pigment

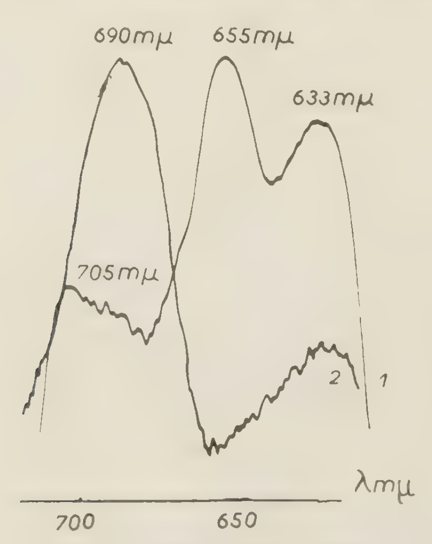


Fig. 9. — Spectre de fluorescence de feuilles de haricots fanées (1) et après irradiation d'une minute (2); ([38]).

au moment de l'exposition). Nous avons observé deux formes de protochlorophylle avec un maximum de fluorescence à 635 et 655 mμ ([38]), la dernière forme étant plus active photochimiquement et se transformant rapidement en des formes intermédiaires de chlorophylle avec maximum d'absorption à 690, 675 et 680 mμ. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par SHIBATA ([39]) qui, en étudiant le processus du verdissement par la spectrophotométrie des feuilles, a trouvé différentes formes de protochlorophylle et des formes intermédiaires de chlorophylle à maxima d'absorption différents.

2. *Étude de la cinétique de photoxydation destructive dans les homogénats de feuilles vertes (suspensions de granule).*

En éclairant intensément à la lumière rouge (10^6 erg/cm^2. sec.) des homogénats de feuilles de betterave sucrière en présence d'air, nous avons remarqué, dans les expériences que nous avons faites avec VOROBYOVA, qu'une partie de la chlorophylle se décolore très rapidement ([40]); ce phénomène s'accompagne d'un affaiblissement de la fluorescence rouge des homogénats. La quantité de cette forme de chlorophylle se décolorant rapidement est différente selon les types de plantes et oscille entre 1 et 20 %. Nous avons trouvé une forte proportion de cette forme dans les feuilles de betterave sucrière, les feuilles de peuplier, etc... et une faible proportion dans les feuilles de céréales ([41]). Il faudrait étudier s'il existe une telle forme instable dans les feuilles intactes des plantes. Dans leurs expériences, FRENCH et YOUNG ([42]) ont remarqué une brusque diminution de la fluorescence de la chlorophylle des algues rouges après irradiation intense; nous pensons que ce phénomène peut s'expliquer par la destruction de la forme de chlorophylle fluorescente « monomère ». Trois formes de chlorophylle avec maxima d'absorption à 690, 675 et 760 mμ ([43]) ont été découvertes en mesurant les spectres d'absorption des algues rouges Phyllophores.

3. *Centrifugation différentielle des différentes formes de chlorophylle.*

En nous basant sur la différence de comportement photochimique de la chlorophylle dans les homogénats, nous avons essayé de séparer ces formes par centrifugation à grande vitesse, car nous pensions que ces formes étaient liées par des éléments structuraux de différentes tailles. En réalité, avec les homogénats de feuilles de plantes possédant une grande quantité de la forme de chlorophylle se décolorant rapidement, une centrifugation, avec champ de 25 000 g , a entraîné un déplacement du maximum d'absorption de la « solution verte » de 677 mμ à 672-673 mμ ([41]).

Propriétés photochimiques de la « solution verte ». — Nous avons étudié les propriétés de la chlorophylle en granules dans des milieux visqueux eau-glycérine, qui permettaient des mesures spectrophotométriques exactes en raison de leur transparence et de leur stabilité du point de vue colloïdal. De tels systèmes permettent également de travailler à basse tempé-

rature. Dans les expériences que nous avons faites avec VOROBYOVA sur de telles solutions vertes de

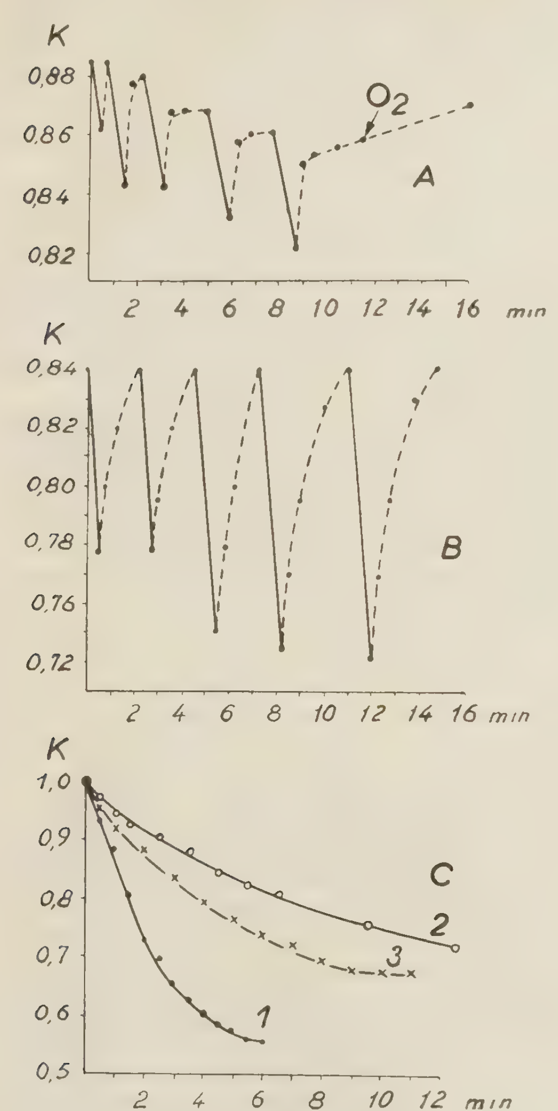


Fig. 10. — Réactions photochimiques dans les homogénats eau-glycérine de feuilles de betterave sucrière vertes en présence d'ascorbate de sodium (dans le vide). Irradiation à la lumière rouge 10^6 erg/cm² sec.
A. Modifications reversibles de la chlorophylle à 675 mμ.
B. Réduction reversible de la safranine T (à 540 mμ) photosensibilisée par la chlorophylle.
C. Réduction irreversible du rouge de méthyle photosensibilisée par la chlorophylle : 1) homogénats de feuilles de betterave sucrière ; 2) de feuilles de blé ; 3) solution colloïdale de la chlorophylle $a + b$ (mesures à 470 mμ —— lumière ---- obscurité.

feuilles de betterave sucrière en présence d'ascorbate de sodium, nous avons observé des modifications reversibles de densité optique dans le maximum rouge (jusqu'à 5 %) par irradiation, ce que l'on peut attribuer à une photoréduction reversible de la chlorophylle. Nous n'avons pas réussi à observer des modifications nettes de densité par les mesures au spectrophotomètre BECKMAN pour 520 mμ. En l'absence d'ascorbate, on observe des effets plus faibles [40]. On peut attribuer les modifications photochimiques reversibles dans les homogénats de feuilles vertes à la forme « monomère » de la chlorophylle, dont les propriétés sont semblables à celles de la chlorophylle en solution.

On sait bien que, dans un milieu oxydant, les homogénats de feuille sont capables de donner une réaction de HILL, c'est-à-dire une évolution photochimique de l'oxygène, liée à une réduction des oxydants, Fe^{+++}, quinones, etc. Le travail que nous avons fait avec VOROBYOVA a montré que, dans un milieu réducteur et s'il y a de l'ascorbate de sodium, les homogénats de feuille sont capables de photosensibiliser la réduction de la safranine-T (reversible) et d'autres composés, aussi bien que la réduction irreversible de l'oxygène et de certains colorants azoïques (rouge de méthyle).

Les feuilles de plantes, contenant une grande quantité de la forme monomère se décolorant rapidement, étaient plus actives dans les réactions de ce type; les feuilles de betterave sucrière, par exemple, sont plus actives que celles de haricots, mais la chlorophylle colloïdale exerce également une certaine activité. Le rôle biologique des différentes formes de chlorophylle et leur mode de participation aux réactions de photosynthèse ne sont pas encore élucidés. Les calculs montrent que deux quanta environ de lumière rouge sont nécessaires pour transférer un électron de l'eau au gaz carbonique; ce phénomène peut exiger deux types de réactions-photochimiques avec une réserve de substrats intermédiaires. Différents types de réaction peuvent être en relation avec les différentes formes de chlorophylle. L'aptitude de la molécule de chlorophylle à capter un électron par irradiation sera de toute façon réservée à un groupe « collectif » de molécules sous des formes agrégées quasi-cristallines. La migration d'énergie entre les molécules de pigment dans de tels agrégats (en granules plastiques) peut se produire sous la forme d'un « trou » et d'un électron non apparié c'est-à-dire à un état de triplet, à l'exemple du mécanisme proposé par TERENIN [44, 45].

V. — Mécanisme de la participation de la chlorophylle et de ses analogues dans les processus photobiologiques.

Photosynthèse. — Les études, décrites dans cet article, montrent la possibilité pour la chlorophylle

de permettre un transfert reversible d'électron jusqu'au niveau des nucléotides de pyridine à l'état réduit, avec formation intermédiaire d'ions-radicaux dans le processus de transfert photochimique d'électron. Cela est compatible avec un certain nombre de recherches récentes qui ont révélé la possibilité de la photoréduction d'un nucléotide de pyridine dans des suspensions de chloroplastes et de feuilles de plantes.

Selon le schéma de CALVIN ([46]), le cycle de la réduction du gaz carbonique est réalisé grâce à l'apport de nucléotides de pyridine réduits photochimiquement et d'esters de phosphates riches en énergie. La formation de tels esters est possible par phosphoration photosynthétique (oxydation), en utilisant des nucléotides de pyridine réduits (flavines) et des oxydants formés dans le photoprocessus ([47]).

Il est excessivement important de découvrir la possibilité de la formation intermédiaire de formes de chlorophylle modifiées photochimiquement au cours de la photosynthèse des feuilles de plantes. Dans des travaux récents, on a utilisé, pour l'étude du photoproduit primaire, des méthodes de spectroscopie différentielle sur des organismes vivants et de résonance paramagnétique. Par irradiation des feuilles les mesures des spectres différentiels ont montré l'apparition reversible d'un maximum d'absorption à 515-530 mμ ([48]), accompagnée d'une chute du maximum rouge de l'absorption de la chlorophylle ([49]), d'une diminution de fluorescence ([50]) et de l'apparition de chimiluminescence dans la réaction inverse obscure ([51]). L'apparition du maximum à 515 mμ peut être en relation avec la formation des formes photoréduites de la chlorophylle et des autres pigments des plantes accepteurs d'électron. On doit cependant considérer le fait que la photoréduction reversible de la chlorophylle n'est pas toujours liée à l'apparition d'un maximum à 520 mμ. Dans les conditions de pH existant dans les granules, il peut arriver qu'il n'y ait pas production de la « forme rouge », sans compter que la forme transitoire active réduite ion-radicalaire de la chlorophylle semble ne pas posséder de maximum dans cette région du spectre.

Les mesures de résonance paramagnétique ont montré que, par irradiation de chloroplastes, il apparaît des électrons non appariés, ce qui prouve la formation de radicaux libres à durées de vie différentes ([52]). Enfin, l'apparition de chimiluminescence photochimique semble être en relation avec la recombinaison des radicaux libres formés dans le photoprocessus. Il restait à relier les résultats obtenus par toutes ces méthodes. Ainsi les résultats expérimentaux sont compatibles avec l'hypothèse de la participation de la chlorophylle au transfert photochimique d'électron dans la photosynthèse, avec formation intermédiaire de radicaux libres à durées de vie différentes.

Action photodynamique des porphyrines. — La base de ce phénomène est la photoxydation des métabolites vitaux ou des protéines photosensibilisée par un colorant, qui conduit à une hémolyse de l'érithrocyte et à un certain nombre de troubles, à longue échéance, des fonctions organiques normales ([53]). Le mécanisme du processus photochimique primaire, qui est la base des effets photodynamiques, n'est pas encore élucidé. Les études du mécanisme de l'effet sensibilisateur des porphyrines, décrites dans ce mémoire, permettent de prouver l'hypothèse que la photoréduction élémentaire du pigment qui est l'acte photochimique primaire de ce processus; nous avons trouvé que la porphyrine était capable de donner une photoréduction reversible avec les diénols, les cystéines et un certain nombre d'autres composés organiques ([5]).

L'oxydation des formes photoréduites de la porphyrine par l'oxygène ou d'autres oxydants conduit à la régénération reversible de la molécule initiale de pigment. Dans ce cas, de même que dans le cas de la chlorophylle, les formes ion-radicalaires de pigment sont les plus actives. On peut donc décrire comme suit le mécanisme du processus élémentaire de l'action photodynamique :

Stade photochimique :

$$\leftarrow \; P + AH \rightarrow .P^- + .AH^+ \rightarrow .PH + .A$$

Stades obscurs :

$$.P^- + O_2 \rightarrow .PO_2^- \xrightarrow{+H^+} P + HO_2, \text{etc...}$$

où P est une molécule excitée de porphyrine, AH une molécule de métabolite ou un petit groupe de protéine, abandonnant un électron. Nous avons étudié tous ces processus *in vitro;* il reste à étudier la formation de photoproduit intermédiaire dans des expériences *in vivo.*

Autres réactions photobiologiques des plantes. — Les études de BORTHWICK et HENDRICK ([54]) sur les spectres d'action du photopériodisme, de la germination des graines, etc., ont conduit à la découverte du maximum des spectres d'action à environ 650 mμ; on supprimait cet effet de la lumière rouge par une irradiation subséquente avec du proche infrarouge ayant un maximum d'action à 740 mμ.

Ces observations ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse de la présence d'un système de pigment subissant des modifications photochimiques avec formation de photoproduits, en relation avec des maxima à 650 et 740 mμ. Jusqu'à présent les tentatives faites, pour observer une telle transformation des pigments dans les plantes, ont échoué. Nous avons réussi à observer une photoréduction reversible de la porphyrine conduisant à la formation de photoproduits avec des maxima d'absorption à 650 et 740 mμ. Le fait que l'irradiation par l'infrarouge accélère la

réaction inverse de ces photoproduits est d'importance ([55]). Il se peut que la formation reversible des produits de la photoréduction du pigment de la porphyrine ait également de l'importance dans un certain nombre de processus photobiologiques de ce type.

BIBLIOGRAPHIE

(1) A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1948, **60**, 421; *Revue dans Zhur. Fis. Khim.*, 1956, **30**, 968.
(2) A. A. Krasnovsky, G. P. Brin et K. K. Voynovskaya. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1949, **69**, 393; 1953, **89**, 527.
(3) A. A. Krasnovsky et K. K. Voynovskaya. — *Doklady, Acad. Nauk.*, 1949, **64**, 663.
(4) A. A. Krasnovsky et K. K. Voynovskaya. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1951, **81**, 879.
(5) A. A. Krasnovsky et K. K. Voynovskaya. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1954, **98**, 1209.
(6) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova. — *Doklady, Acad. Nauk.*, 1954, **96**, 1201.
(7) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1954, **95**, 841.
(8) A. A. Krasnovsky et G. P. Brin. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1950, **73**, 1239.
(9) E. Rabinowitch. — *J. Chem. Phys.*, 1940, **8**, 551, 560.
(10) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1953, **92**, 381.
(11) V. B. Evstigneev. — *Diss. Institute Biochim. Acad. Nauk. URSS*, Moscou, 1956.
(12) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1955, **103**, 97.
(13) A. A. Krasnovsky et A. B. Umrichina. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1955, **104**, 882.
(14) A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1955, **103**, 283;
A. A. Krasnovsky et K. K. Voynovskaya. — *Biofizika*, 1956, **1**, 120.
(15) B. Hill. — *Nature*, 1954, **174**, 501.
(16) A. A. Krasnovsky et G. P. Brin. — *Doklady Acad. Nauk.* 1954, **96**, 1025.
(17) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1957, **115**, 530.
(18) D. Porret et E. Rabinowitch. — *Nature*, 1937, **140**, 321.
(19) R. Livingston. — *J. Phys. Chem.*, 1941, **45**, 312; 1948, **52**, 622;
R. Livingston et V. Ryan. — *J. am. chem. Soc.*, 1953, **75**, 2176.
(20) H. Linshitz et J. Rennert. — *Nature*, 1952, **169**, 193.
(21) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova. — *Doklady Acad. Nauk.* 1956, **108**, 507.
(22) V. B. Evstigneev et A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1948, **60**, 623;
V. B. Evstigneev, V. A. Gavrilova et A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1950, **74**, 315.
(23) N. Uri. — *J. am. chem. Soc.*, 1952, **74**, 5808.
(24) J. L. Rosenberg. — *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1957, **8**, 115.
(25) Linshitz et S. J. Weissman. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **67**, 491.
(26) M. S. Ashkinazy et B. Y. Dain. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1951, **80**, 385; 1956, **102**, 767.
(27) V. B. Evstigneev, V. A. Gavrilova et A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1950, **70**, 261.
(28) A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1948, **61**, 91.
(29) A. A. Krasnovsky et G. P. Brin. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1949, **67**, 325;
A. A. Krasnovsky et K. K. Voynovskaya. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1952, **87**, 190.
(30) G. P. Brin et A. A. Krasnovsky. — *Biochima* N° 5, 1957;
A. A. Krasnovsky et G. P. Brin. — *Doklady Acad. Nauk.*, 1947, **58**, 1087.
31) A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk. URSS.*, 1947, **58**, 617, 835.
(32) V. B. Evstigneev et V. A. Gavrilova. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1954, **98**, 1017.
(33) V. B. Evstigneev et A. N. Terenin. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1951, **81**, 223.
((34) A. A. Krasnovsky et G. P. Brin. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1948, **63**, 163.
(35) A. A. Krasnovsky et G. P. Brin. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1946, **53**, 447.
A. A. Krasnovsky. — *Problems of Kinetics and Catalysis*, 1955, **8**, 40, *A.N. URSS*, Moscou.
(36) A. A. Krasnovsky et L. M. Kosobutskaya. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1952, **85**, 177; 1953, **91**, 343; 1953, **92**, 1201.
(37) J. H. C. Smith et A. Benitz. — *Year Book Carnegie Inst. Wash.*, 1953, **52**, 149.
(38) F. F. Litvin et A. A. Krasnovsky. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1957, **117**, 168.
(39) K. Shibata. — *Journ. de Biochimie* (Japan), 1957, **44**, 147.
(40) A. A. Krasnovsky et L. M. Kosobutskaya. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1955, **104**, 440.
L. M. Vorobyova et A. A. Krasnovsky. — *Biokhimiya*, 1956, **21**, 126.
(41) A. A. Krasnovsky, L. M. Vorobyova et E. V. Paskchina. — *Physiologie des plantes*, 1957, **4**, 124.
(42). C. S. French et V. K. Young. — *J. Gen. Physiol.*, 1952, **35**, 873.
(43) A. A. Krasnovsky, E. A. Nesterovskaya et A. B. Goldenberg. — *Biofizika*, 1953, **1**, 328.
(44) A. N. Terenin et V. L. Ermolayev. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1952, **85**, 547.
(45) A. N. Terenin et V. L. Ermolayev. — *Trans. Farad. Soc.*, 1956, **52**, 1042.
(46) M. Calvin. — *Conférences et rapports*; 3e Congrès International de biochimie, 1956, p. 211, Liège.
(47) D. Arnon. — *Science*, 1955, **122**, 9.
(48) L. M. N. Duysens. — *Science*, 1954, **120**, 353.
L. N. Bell. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1957 **107**, 329.
(49) J. W. Coleman, A. S. Holt et E. Rabinowitch. — *Science*, 1956, **123**, 795.
(50) H. T. Witt. — *Zeit. Electrochem.*, 1955, **59**, 981.
(51) B. L. Strehler et V. H. Lynch. — *Science*, 1956, **123**, 462.
(52) B. Commoner, J. Heiss et J. Townsend. — *Proc. Natl. Acad. Science, Wash.*, 1956, **42**, 710.
B. Sogo, N. Pon et M. Calvin. — *Proc. Natl. Acad. Science. Wash.*, 1957, **43**, 387.
(53) H. Blum. — *Photodynamic action and diseases caused by light*, 1941.
(54) H. A. Borthwick, S. B. Hendricks et al. — *Proc. Natl. Acad. Science. Wash.*, 1952, **38**, 62.
(55) A. A. Krasnovsky et K. K. Voynovskaya. — *Doklady Acad. Nauk. URSS*, 1957, **112**, 911.

INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA FIXATION DE L'AZOTE

par N. R. DHAR.

[*Shella Dhar Institute of Soil Science, University of Allahabad.*]

SOMMAIRE

Les résultats expérimentaux montrent que les hydrates de carbone solubles, les mélasses, les graisses, les celluloses, la lignine, les matières organiques contenant des celluloses et de la lignine telles que la paille, la sciure de bois, les feuilles, la tourbe, la lignite et le charbon bitumeux, subissent une lente oxydation à l'air, même à l'obscurité, lorsqu'on les mélange à des sols ou des oxydes de zinc, aluminium, fer, nickel, cobalt, manganèse, etc., en présence d'eau. Cette oxydation lente se produit aussi bien dans des conditions stériles que non stériles. La vitesse d'oxydation est plus grande en condition non stérile qu'en condition stérile. Dans ces oxydations lentes, l'énergie est libérée comme dans l'équation suivante correspondant au cas du glucose :

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O + 678 \text{ calories.}$$

L'énergie libérée est utilisée pour la fixation de l'azote de l'air ou des surfaces de sols ou d'oxydes, avec formation d'ammoniaque, d'acides aminés et d'autres substances azotées. Lorsque les systèmes sont exposés à la lumière solaire ou artificielle, la quantité d'azote fixée en présence de lumière est beaucoup plus grande que celle qu'on obtient à l'obscurité. Dans des conditions non stériles, les nombres d'*Azotobacter* sont toujours beaucoup plus faibles en présence de lumière qu'à l'obscurité, quoique la quantité d'azote fixée par gramme de carbone oxydé à la lumière soit plus importante qu'à l'obscurité.

Les molécules d'eau présentes sur les surfaces de sol ou d'oxydes subissent une décomposition selon l'équation :

$$H_2O + 112 \text{ cal} = H + OH$$

par absorption de l'énergie provenant de l'oxydation des substances organiques. L'hydrogène atomique produit réduit 'azote moléculaire, d'où il résulte une formation d'ammoniaque qui peut être oxydé en nitrate; ceux-ci peuvent être transformés en acides aminés en présence de matériaux énergétiques. Le radical OH peut former de l'eau oxygénée qui oxyde les substances organiques. Lorsqu'on illumine les systèmes, l'énergie lumineuse y est absorbée et est réellement utilisée pour augmenter la fixation de l'azote. Il apparait que la source la plus importante d'azote combiné présent dans les sols à la surface du globe réside dans cette fixation de l'azote atmosphérique principalement par une réaction de surface à l'aide de l'absorption lumineuse.

Il y a vingt ans, dans une communication à cette Société, nous avons produit des résultats montrant que le phénomène de la fixation de l'azote atmosphérique est accéléré par absorption de lumière et que ce processus est à beaucoup d'égards semblable à la photosynthèse des plantes. Cette fixation d'azote semble être le phénomène le plus important pour l'humanité, après la photosynthèse des plantes. Dans les conditions naturelles, l'énergie chimique obtenue par oxydation des matériaux des plantes et l'énergie solaire sont réellement utilisées pour la fixation de l'azote sur les sols de toute la surface du globe. Nous avons poursuivi un grand nombre de travaux expérimentaux sur ce type de fixation de l'azote atmosphérique à l'aide de l'énergie chimique et de l'énergie lumineuse.

Utilisation de l'énergie chimique et de l'énergie lumineuse dans la fixation de l'azote sur les sols et les surfaces d'oxydes dans des conditions stériles ou non stériles.

Pendant un certain nombre d'années, nous avons étudié l'oxydation de substances productrices d'énergie, en mélange avec des sols ou du sable ou différentes surfaces d'oxydes, en conditions stériles ou non stériles à la lumière ou à l'obscurité. Dans chaque cas, en même temps que l'oxydation des matériaux énergétiques et la perte de carbone dans le système, il se produit toujours une augmentation de la teneur totale des composés azotés organiques et inorganiques par fixation de l'azote atmosphérique. Dans les expériences à la lumière, les mélanges étaient exposés soit à la lumière du soleil soit à la lumière artificielle pendant 8 h par jour. Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans les tableaux I, II, III, IV et V.

Dans ce qui précède, on voit clairement que la quantité d'azote fixée dans le sol, dans les carrés de terrain ainsi que dans les assiettes, est toujours environ deux fois plus importante à la lumière qu'à l'obscurité, bien que le nombre des bactéries à l'obscu-

rité soit beaucoup plus grand qu'à la lumière. De plus, la taille des colonies se développant sur les assiettes contenant les sols incubés à l'obscurité, est beaucoup plus grande que celle des colonies

FIXATION D'AZOTE A L'AIDE D'HYDRATES DE CABONE

TABLEAU I

50 g. de sol + 1 g glucose + 25 cm² eau; température : 34 °C à 55 °C.

Exposition (jours)	Carbone total non oxydé % (g)	Carbone total oxydé % (g)	Azote total en mg %	Gain total d'azote en mg.	Rendement : azote fixé par gramme de carbone oxydé	Azotobacter en millions par gramme de sol sec.
—	—	—	—	—	—	—
		(non stérile)		(lumière)		
0	1,1796	...	32,20	...	...	2,8
25	1,0194	0,1602	34,09	2.09	13,05	...
45	0,8389	0,3407	36,53	4,33	12,72	6,2
65	0,7283	0,4513	37,71	4,51	12,20	...
85	0,6388	0,5408	38,45	6,25	11,55	2,6
		(non stérile)		(obscurité)		
0	1,1796	...	32.20	...	...	2,8
25	1,0659	0,1137	32,91	0,71	6,20	...
45	0,9088	0,2708	33,80	1,60	5,92	32,5
65	0,7984	0,3812	34,36	2,16	5,66	...
85	0,6991	0,4805	34,82	2,62	5,45	167,2

TABLEAU II

Exposition (jours)	Carbone total non oxydé % (g)	Carbone total oxydé % (g)	Azote total en mg %	Gain total d'azote en mg	Rendement
—	—	—	—	—	—
		(stérile)		(lumière)	
0	1,1796	...	32,20	...	...
60	0,9535	0,2261	34,73	2,53	11,20
90	0,8412	0,3384	35,91	3,71	10,25
120	0,7589	0,4207	36,71	4,51	10,72
135	0,7311	0,4485	36,93	4,73	10,55
		(stérile)		(obscurité)	
0	1,1796	...	32,20	...	...
60	1,0700	0,1096	32,73	0,53	4,85
90	0,9674	0,2192	33,20	1,00	4,72
120	0,8886	0,2910	33,54	1,34	4,60
135	0,8754	0,3643	33,55	1,35	4,15

TABLEAU III

Sol témoin dans des conditions identiques.

Exposition (jours)	Carbone total % non oxydé (g)	Azote total % (mg)	Azotobacter en million par gramme de sol sec	% carbone total non oxydé (g)	% Azote total (mg)	Azotobacter en million par gramme de sol sec
—	—	—	—	—	—	—
	(non stérile)		(lumière)		(obscurité)	
0	0,3796	32,20	2,8	0,3796	32,20	2,8
45	0,3748	31,90	2,6	0,3750	32,90	2,8
85	0,3686	31,40	3,1	0,3725	32,60	3,1
	(stérile)		(lumière)		(obscurité	
0	0,3796	32,20	...	0,3796	32,20	...
60	0,3756	31,90	...	0,3782	32,10	...
135	0,3706	31,50	...	0,3768	31,90	...

exposées à la lumière. Il apparaît donc que la lumière solaire affaiblit l'*Azotobacter*. Si l'on admet que l'activité métabolique bactérienne va de pair avec l'activité de croissance, la fixation d'azote atmosphérique dans les échantillons incubés et maintenus à l'obscurité aurait dû être plus importante que dans ceux qui ont été exposés à la lumière, si aucun autre facteur n'était responsable de la fixation d'azote. C'est pourquoi, dans les sols tropicaux, la fixation photochimique semble jouer un rôle *au moins* aussi important que la fixation bactérienne.

TABLEAU IV

Essais sur le terrain.

Surface de 4 pieds × 4 pieds contenant 4 kg d'amidon.

Date	Azote total %	Carbone total %	Humidité %	Azotobacter par g de sol sec en millions	Nombre total de bactéries par g de sol sec en mill.
12.3.1937 (sol original)	0,0311	0,3374	1,5	1,5 (lumière)	13,5
12.3.1937	0,0333	1,0622	3,0	6,5	26,0
27.4.1937	0,0365	0,8618	4,0	48,0	140,0
24.5,1937	0,0388	0,7442	3,0	75,0	195,0
10.6.1937	0,0407	0,6702	3,5	70,0	210,0
11.7.1937	0,0424	0,5594	...	76,0	215,0
29.9.1937	0,0411	0,4684	4,0	35,0	175,0

Azote fixé par gramme de carbone oxydé : 16,5 mg.

Date	Azote total %	Carbone total %	Humidité %	Azotobacter par g de sol sec en millions	Nombre total de bactéries par g de sol sec en mill.
13.2.1937 (sol original)	0,0420	0,4360	1,5	1,5 (obscurité)	13,5
12.3.1937	0,0437	1,1924	4,0	8,5	31,5
27.4.1937	0,0456	1,0214	4,0	70,0	205,0
24.5.1937	0,0462	0,9258	3,5	105,0	245,0
10.6.1937	0,0466	0,8205	4,5	130,0	282,3
11.7.1937	0,0472	0,7036	4,0	165,0	345,0
27.9.1937	0,0482	0,4864	4,8	162,6	350,8

Azote fixé par gramme de carbone oxydé : 5,9 mg.

TABLEAU V

Expériences en assiettes.

1 kg sol + 20 g fructose; température 34 - 42 °C.

(sol original)	lumière		
8.10.1936	0,0570	0,6156	5,2
25.10.1936	0,0570	1,3568	6,1
1.12.1936	0,0608	1,1518	19,8
19.1.1937	0,0646	0,7614	29,8
5.2.1937	0,0656	0,6346	23,0
7.3.1937	0,0626	0,6126	10,5

Azote fixé par gramme de carbone oxydé : 11,9 mg.

(sol original)	(obscurité)	(Temp. 28 - 31°)	
8.10.1936	0,0570	0,6156	5,2
25.10.1936	0,0570	1,3745	7.2
1.12.1936	0,0590	1,2429	35.8
19.1.1937	0,0612	0,9876	225.5
5.2.1937	0,0618	0,7318	275.0
7.3.1937	0,0622	0,6126	290,0

Azote fixé par gramme de carbone oxydé : 6,8 mg.

Récemment, nous avons fait une série d'expériences dans des conditions complètement stériles et, également dans de tels cas, nous avons obtenu une fixation d'azote non seulement avec des sols stériles mais également avec des surfaces telles que ZnO, Fe_2O_3, Al_2O_3, MnO_2, etc. (voir tableaux VI, VII et VIII).

TABLEAU VI

Les expériences suivantes ont débuté le 12 septembre 1939.
50 g sol + 1 g glucose. Sols en flacons de quartz analysés le 1er mars 1939.
Azote total : 0,0424 %; carbone total : 0,4305 %.

Substance	Azote total % (lumière)	Carbone total % (lumière)	Azote total % (obscurité)	Carbone total % (obscurité)
Inuline......	0,0464	0,7732	0,0424	0,9924
Arabinose ...	0,0448	0,7904	0,0424	0,9826
Fructose	0,0464	0,7635	0,0432	0,9786
Lactose	0,0456	0,7816	0,0424	0,9924
Glucose	0,0456	0,7635	0,0432	0,9562
Mannitol ...	0,0456	0,7732	0,0424	0,9826
Glycérol.....	0,0448	0,8048	0,0424	0,8968
Galactose ...	0,0456	0,7732	0,0424	1,0056
Maltose	0,0464	0,7735	0,0424	1,1026
Dextrine	0,0464	0,7732	0,0432	0,9826
Amidon	0,0448	0,9264	0,0424	1,1206
Témoin	0,0408	0,3986	0,0416	0,4208

Sols en flacons Pyrex — analysés le 27 mars 1939.

Substance	Azote total % (lumière)	Carbone total % (lumière)	Azote total % (obscurité)	Carbone total % (obscurité)
Inuline	0,0456	0,8968	0,0424	1,1264
Arabinose ..	0,0448	0,9086	0,0424	1,0086
Fructose	0,0448	0,9156	0,0432	0,9924
Glucose ...	0,0448	0,8892	0,0424	0,9638
Amidon	0,0432	1,1026	0,0424	1,1284
Témoin	0,0416	0,4208	0,0416	0,4208

Il est du plus haut intérêt de remarquer que l'azote fixé par gramme de carbone oxydé dans des conditions complètement stériles pour des sols dans des récipients en quartz, est de 12,2 mg à la lumière et 4,5 mg à l'obscurité.

TABLEAU VII

Fixation sur oxydes non stériles.
50 g d'oxyde (ne contenant aucun composé azoté) + 1 g glucose.
Les expériences ont débuté le 25 février 1940 et ont été analysées le 28 avril 1940.

	lumière			obscurité		
	Azote total %	Carbone total %	Nombre total de bactéries en millions/g d'oxyde	Azote total %	Carbone total %	Nombre total de bactéries en millions p.g. d'oxyde
—	—	—	—	—	—	—
MnO_2	0,015	0,3128	1,96	0,0058	0,4286	2,92
CuO	0,0088	0,5092	0,62	0,0027	0,6498	0,88
CoO	0,0187	0,3035	1,02	0,0085	0,4012	3,20
Ni_2O_3	0,0235	0,2968	0,98	0,0100	0,3862	2,98

Azote fixé par de carbone oxydé:

	lumière	obscurité
	—	—
MnO_2	30,78 mg	15,61 mg
CuO	30,26	17,97
CoO	37,66	21,31
Ni_2O_3	46,7	24,16

TABLEAU VIII

Fixation d'azote sur oxydes de métaux dans des conditions stériles (flacon Pyrex de 1 litre) à la lumière en présence de glucose.
25 g d'oxyde + 0,5 g de glucose.
Les expériences ont débuté le 13 février 1940 et ont été analysées le 1er septembre 1940.

	Azote total %	Carbone total %	Azote fixé par gramme de carbone oxydé
		lumière —	
ZnO	0,0048	0,4826	15.12 mg
Al_2O_3	0,0038	0,5348	14.33
Fe_2O_3	0,0056	0,5016	18.76
Ni_2O_3	0,0056	0,4972	18.49
CoO	0,0048	0,5124	16.66
CuO	0,0020	0,6628	14.43
MnO_2	0,0048	0,4624	14.21
		obscurité —	
ZnO	0,0017	0,5892	8,06
Al_2O_3	0,0017	0,6084	8,87
Fe_2O_3	0,0020	0,6172	10,94
Ni_2O_3	0,0020	0,6108	10.57
CoO	0,0020	0,6084	10,42
MnO_2	0,0017	0,6084	8,87

Pareillement, comme il résulte des expériences conduites dans des récipients en Pyrex, qui transmet moins de lumière que le quartz, spécialement dans l'ultraviolet, la fixation moyenne d'azote est de 10,74 mg/g de carbone oxydé dans des conditions parfaitement stériles à la lumière, tandis que la fixation à l'obscurité est de 4,5 mg. L'ordre de grandeur de ces quantités correspondant à des conditions stériles est pratiquement le même que dans des sols non stérilisés.

On voit donc que l'efficacité de la fixation d'azote, que le sol contienne des *Azotobacter* ou qu'il soit stérile, est pratiquement la même. Autrement dit, la façon dont le matériel énergétique est oxydé et dont l'énergie est libérée ne modifie pas l'efficacité de ce processus.

D'après les résultats précédents, il est clair que la quantité d'azote fixé par gramme de carbone oxydé dans le cas de surfaces comme ZnO, Al_2O_3, Fe_2O_3, Ni_2O_3, CoO, MnO_2, etc., avec du glucose comme matériel énergétique, est beaucoup plus grande que dans le cas de sols dans des conditions comparables, à la lumière comme à l'obscurité, dans des conditions stériles ou non stériles. Ces résultats montrant que la fixation d'azote est possible avec des surfaces pures à la lumière comme à l'obscurité, et que le rendement de ce processus est plus grand avec les oxydes qu'avec les sols, sont d'une importance fondamentale. Pour la fixation de l'azote, les sols non plus que les bactéries ne sont absolument nécessaires; ce qui semble réellement indispensable c'est une surface convenable où l'oxygène, l'azote, l'eau et la substance énergétique sont adsorbés d'une façon appropriée et se trouvent en contact intime. La substance énergétique en contact avec l'oxygène est oxydée sur la surface et produit l'énergie nécessaire pour la combinaison de l'azote et de l'oxygène. Quand la lumière agit sur ce système, une partie de celle-ci est absorbée et détermine une augmentation de la

fixation de l'azote. C'est ainsi que dans tous les cas la fixation d'azote est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité.

Mécanisme de la fixation de l'azote.

Pour expliquer la photosynthèse des plantes, Dhar supposa en 1932 que la réaction photochimique importante est la décomposition de molécules d'eau par absorption de lumière suivant l'équation :

$$H_2O + 112 \text{ cal} = H + OH$$

L'atome d'hydrogène ainsi formé réduit l'acide carbonique adsorbé sur les feuilles et donne du formaldéhyde, du glucose, de l'amidon, etc. Au cours de ces dernières années, cette conception du mécanisme de la photosynthèse a été confirmée par des expériences avec de l'acide carbonique contenant du carbone isotopique. Pour expliquer la fixation de l'azote, le meilleur mécanisme semble être le même, c'est-à-dire la décomposition de molécules d'eau en H et OH par absorption de l'énergie provenant de l'oxydation lente des hydrates de carbone, des celluloses, des lignines, des graisses, des charbons, etc. De plus, en présence de lumière, l'énergie lumineuse, qu'elle provienne du soleil ou d'une source artificielle, est absorbée par le système et est utilisée pour augmenter la fixation d'azote. Dans le cas de la fixation symbiotique de l'azote également, le même mécanisme peut intervenir. La décomposition des molécules d'eau à la surface du sol est facilitée par leur adsorption et par la photosensibilisation, due à la présence de photosensibilisateurs, comme des composés du fer, du titanium, etc., dans le sol.

Il est bien connu que la fixation d'azote dans les sols ne se produit pas en absence d'humidité parce que l'eau joue un rôle prépondérant, comme nous le postulons, dans le mécanisme de fixation de l'azote proposé ci-dessus. L'ammoniaque formée dans ce processus peut être facilement oxydée en nitrate dans les sols et les nodules. Dhar et Mukherji ont obtenu directement des acides aminés par action de nitrates sur des hydrates de carbone en présence de lumière avec de l'oxyde de titane comme photocatalyseur.

Augmentation de la synthèse des acides aminés par les phosphates dans une solution de nitrate et d'hydrate de carbone exposée à la lumière.

En 1934, Dhar et Mukherji ont découvert qu'il se produisait une synthèse d'acides aminés lorsqu'on exposait une solution d'un nitrate et de glucose ou quelque autre substance énergétique soluble mélangée avec de l'oxyde de titane comme photocatalyseur à la lumière solaire ou à la lumière artificielle. La présence des acides aminés peut être décelée même après une exposition de 1 h dans le mélange, par le test bien connu de la ninhydrine. Récemment, nous avons fait un grand nombre d'expériences sur la synthèse des acides aminés par cette méthode dans des conditions complètement stériles, et nous avons observé que la quantité d'acides aminés synthétisés augmentait sensiblement en présence de phosphates solubles.

DISCUSSION

E. Rabinowitch. — Des bactéries chimiosynthétiques ou photosynthétique peuvent utiliser pratiquement chaque source d'énergie chimique pour la réduction de CO_2 ou la fixation d'azote, en commençant par l'oxydation de l'hydrogène. Ce sont de vrais agents de couplage chimique et nous ne savons presque rien du mécanisme de ce couplage. Les fixations d'azote à grande échelle que vous avez observées, ne sont-elles pas dues, elles aussi, à l'activité des bactéries nourries par la mélasse ou les autres matériaux organiques que vous avez introduits dans le sol. Les algues bleu-vert peuvent, elles aussi, fixer l'azote au cours de leur métabolisme photosynthétique et Mrs. Bell a démontré à Berkeley qu'on peut utiliser la culture de ces organismes pour engraisser le sol en azote.

N. R. Dhar. — Le fait que les bacétries ne sont pas responsables de la fixation d'azote dans les sols est démontré par le fait que la fixation d'azote se produisant dans l'oxydation lente de matériaux énergétiques est accentuée par l'absorption de lumière. De plus le nombre d'Azobacter dans le sol contenant des matériaux énergétiques et recevant de la lumière solaire ou de la lumière artificielle est beaucoup plus faible que dans l'obscurité. Mais la quantité d'azote fixée par g de carbone oxydé est beaucoup plus importante à la lumière qu'à l'obscurité.

G. Schay. — Est-ce que les atomes de H réagissent avec l'azote? N'est-il pas plus probable que des atomes d'O sont produits à partir des peroxydes formés dans le processus d'oxydation du glucose.

N. R. Dhar. — M. Schay a parfaitement raison; la réaction suivante

$$N_2 + O_2 + 43{,}2 \text{ kcal} = 2\,NO$$

se produit à température élevée.

TABLE DES AUTEURS

D

E

F

G

H

I

J

K

L

M

N

O

P

R

S

T

W

Z

Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique

I. — PUBLICATIONS PÉRIODIQUES.

BULLETIN SIGNALÉTIQUE

Le Centre de Documentation du C.N.R.S. publie un « Bulletin Signalétique » dans lequel sont signalés par de courts extraits classés par matières, tous les travaux scientifiques, techniques et philosophiques, publiés dans le monde entier.

Le Centre de Documentation du C.N.R.S. fournit également la reproduction sur microfilm ou sur papier des articles signalés dans le « Bulletin signalétique » ou des articles dont la référence bibliographique précise lui est fournie.

ABONNEMENT ANNUEL

(y compris la table générale des auteurs)

1re *Partie.*

	France	*Etranger*
Mathématiques, Physique, Chimie, Sciences de l'ingénieur	10 000 F	12 000 F
Tirages à part.		
Section V. — Chimie générale et Chimie physique	1 400 F	1 800 F
Section VI. — Chimie minérale, Chimie organique, Chimie appliquée, Métallurgie	5 100 F	5 500 F
Section VII. — Sciences de l'ingénieur	3 500 F	3 900 F

ABONNEMENT AU CENTRE DE DOCUMENTATION DU C.N.R.S., 16, rue Pierre-Curie, Paris, 5e.
C.C.P. Paris 9131-62. Tél. DANton. 87-20.

JOURNAL DES RECHERCHES DU C.N.R.S. (*Directeur:* Rose).

Revue trimestrielle publiant des articles de recherches faites dans les différents laboratoires du C.N.R.S.

Abonnement d'un an (4 numéros)	800 F	1 000 F
Prix du numéro	220 F	275 F

CAHIER DU GROUPE FRANÇAIS D'ÉTUDES DE RHÉOLOGIE

Abonnement (4 numéros par an)	1 600 F
Numéro isolé	500 F

II. — OUVRAGES.

Fabry. — *L'ozone atmosphérique*	1 200 F
Françon. — *Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel*	1 000 F
Nahmias. — *Le neutrino*	240 F
Cotton (A.). — *Œuvres Scientifiques*	1 400 F
Langevin (P.). — *Œuvres Scientifiques*	2 400 F
Perrin (J.). — *Œuvres Scientifiques*	1 800 F
Duval. — *English for the Scientist*	450 F
Duval. — *Science is Power*	560 F
Duval. — *Wer sucht, der findet*	450 F
Duval. — *Besser spät als nie*	450 F
Vacher. — *Techniques physiques de Microanalyse biochimique*	400 F
Dumas. — *Les épreuves sur échantillon*	1 000 F

III. — COLLOQUES INTERNATIONAUX

II.	Hauts polymères	400 F
III.	Spectres moléculaires	750 F
V.	Échanges isotopiques et structure moléculaire	700 F
VI.	Anti-vitamines	800 F
XVII.	Polarisation de la matière	1 800 F
XIX.	Absorption et cinétique hétérogène	2 400 F
XX.	La combustion du carbone	1 800 F
XXIV.	Cinquantenaire de la découverte du radium	1 000 F
XXVI.	Mécanisme de la narcose	1 600 F
XXX.	Réarrangements moléculaires et inversion de Walden	2 000 F
XXXVII.	Les machines à calculer modernes et la pensée humaine	2 000 F
XXXVIII.	Particules fondamentales et noyaux	1 800 F
XXXIX.	Électrolyse	1 500 F
LI.	Physiopathologie du potassium	2 000 F
LVI.	L'hydroxycarbonylation	1 000 F
LVII.	Aspects généraux de la Science des macromolécules (relié plein pellior rouge)	1 000 F
LVIII.	Les techniques récentes en microscopie électronique et corpusculaire (relié pellior)	2 000 F
LXI.	L'état actuel des connaissances sur les propriétés électriques et magnétiques des lames métalliques minces en liaison avec leur structure	1 000 F
LXV.	Analyse factorielle et ses applications (relié pellior)	1 500 F
LXVI.	La biochimie du soufre chez les animaux supérieurs (relié pellior)	1 300 F
LXVIII.	Les échanges de matières au cours de la genèse des roches grenues, acides et basiques	3 000 F
LXIX.	Chimie et biochimie des hétérocycles oxygénés	2 500 F
LXXIII.	Électrochimie. Électrodes de Référence et Constitution de la couche double	2 400 F

IV. — COLLOQUES NATIONAUX

10. La chimie des hautes températures	2 000 F
11. La structure chimique des protéines	500 F

V. — LE C.N.R.S. ET SES LABORATOIRES

Le Centre d'Étude de Chimie Métallurgique	600 F
Le Laboratoire de Biochimie de la Nutrition	500 F
Le Groupe des Laboratoires de Bellevue	1 000 F
Centre de Recherches sur les Macromolécules de Strasbourg	800 F

RENSEIGNEMENTS ET VENTE AU SERVICE DES PUBLICATIONS DU C.N.R.S., 13, quai Anatole-France, Paris, 7e.
C.C.P. Paris 9061-11. Tél. INV. 45-95.

DEUXIEME CONGRES INTERNATIONAL DE CATALYSE

(Paris, 4-9 juillet 1960)

Le deuxième congrès international de catalyse se tiendra à Paris du 4 au 9 juillet 1960. Le programme des travaux est fixé comme suit.

I. Cinétique et Mécanisme de la réaction catalytique

Cette section devra accueillir préférentiellement les communications traitant des sujets suivants :

- facteurs communs à toutes les catalyses
- processus élémentaires
- formes actives intermédiaires

étant entendu que l'objectif principal demeure la catalyse hétérogène et qu'il convient de laisser de côté les travaux concernant l'étude de réactions particulières.

II. Propriétés physico-chimiques des catalyseurs et activité catalytique

Cette section concerne essentiellement la catalyse hétérogène. Elle doit réunir les communications visant à établir, à la lumière des diverses théories de l'action catalytique des solides, des liens entre cette action et les propriétés texturales (porosité), structurales (organisation cristalline, propriétés électriques, magnétiques, électrochimiques...) et superficielles des masses de contact. Mais elle est également ouverte à des communications, comme celles qui traiteraient de la configuration électronique d'individualités actives qui, bien que ne concernant pas la catalyse hétérogène, feraient appel aux mêmes conceptions théoriques.

Par contre, l'élaboration du solide catalytique ne peut être prise en considération que dans la mesure où son étude est liée à celle des propriétés nécessaires à l'activité en catalyse. Un congrès sur la réactivité de l'état solide doit en effet se tenir en 1960 à Amsterdam, congrès auquel devraient être réservés les travaux concernant cet aspect des catalyseurs solides.

Dans l'une et l'autre de ces sections, une place sera faite aux nouvelles méthodes d'investigation.

III. Catalyse appliquée

Le Congrès doit avoir parmi ses objectifs essentiels d'ouvrir aux participants scientifiques le vaste champ d'observations que constitue l'activité industrielle dans le domaine de la catalyse de contact. Les communications qui seront retenues préférentiellement pour être présentées dans cette section seront susceptibles de mettre en lumière l'influence mutuelle des recherches fondamentales et des efforts de perfectionnement technique.

●

Dans chaque section, le bureau sera assisté d'un rapporteur chargé de la présentation d'un mémoire d'introduction. Les communications seront présentées sous forme abrégée afin de permettre une large discussion. Au cours de celle-ci, il est souhaitable que les membres du Congrès ne se limitent pas à confronter points de vue et résultats.

Le Congrès étant principalement axé sur la catalyse hétérogène, il est prévu un petit nombre de conférences plénières portant sur les autres domaines de la catalyse.

Les langues officielles du Congrès seront le français, l'anglais et l'allemand.

Nombre des communications et conférences.

Il apparaît hautement souhaitable que tous les exposés et discussions puissent être suivis par l'ensemble des participants. Il est prévu, en conséquence, que le nombre total des communications et conférences ne pourra dépasser quatre-vingts.

Délai d'envoi des communications.

Les titres et résumés des communications proposées devront parvenir au Comité d'organisation avant le 1er novembre 1959. Les textes des mémoires devront être remis avant le 1er janvier 1960, afin que les prétirages puissent être distribués un mois avant l'ouverture du Congrès. Les instructions relatives à la présentation des mémoires seront précisées en temps utile.

Publication des travaux du Congrès.

Les communications présentées et leurs discussions, les mémoires d'introduction des rapporteurs auxquels seront jointes par la suite leurs conclusions sur les travaux du Congrès, les conférences plénières seront groupées et publiées dans un volume qui paraîtra à la fin de l'année 1960.

COMITÉ EXÉCUTIF

Président : M. PRETTRE.
Vice-Présidents : P. LAFFITTE, R. NAVARRE.
Secrétaire Général : G. EMSCHWILLER.
Secrétaires Techniques : J. C. BALACEANU, B. IMELIK, S. TEICHNER.
Secrétaire aux Publications : Mme J. FUNCK.
Secrétaire administratif et financier : A. SAINT MAXEN.

Toute la correspondance relative au deuxième Congrès international de Catalyse doit être adressée au Secrétaire Général du Congrès, École Supérieure de Physique et de Chimie, 10, rue Vauquelin, Paris-5e (France).

SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE

Reconnue d'Utilité Publique par décret du 9 Août 1937

BULLETIN D'ADHESION

à renvoyer au Secrétaire Général, G. Emschwiller
École supérieure de Physique et de Chimie, 10, rue Vauquelin, Paris Ve

---

Je demande mon admission au titre de Membre de la Société de Chimie Physique, avec abonnement au Journal de Chimie Physique

Nom du Demandeur : ....

Prénom : ....

Titres ou Profession : ....

....

Adresse : ....

A ...., *le* 19

MM. ....

consentent à presenter ma candidature.

Signature du demandeur : ....

Signature des parrains : ....

....

CHARTRES IMPRIMERIE DURAND. — Dépôt légal N° 2392. — Le Gérant : M. CHÂTELET

Printed in France.

JOURNAL DE CHIMIE PHYSIQUE

(10 fascicules par an)

PRIX DE L'ABONNEMENT 1958

(Frais d'envoi compris.)

France	5 000 francs
Étranger	6 000 francs

Pour les membres de la Société de Chimie Physique

(Cotisation et frais d'envoi compris)

France	4 000 francs
Étranger	5 000 francs

Les abonnements pris par les libraires ne sont acceptés qu'aux prix de Frs : 5 000 pour la France et Frs : 6 000 pour l'Étranger.

Règlements :

Tous les règlements doivent être effectués à l'ordre du Trésorier de la Société de Chimie Physique, 11, rue Pierre-Curie, Paris, 5e (Comptes chèques postaux, Paris, No 61-31).

Agent exclusif pour les U. S. A. et le Canada : STECHERT-HAFNER, Inc., 31 East 10 th Street, New-York, 3. N. Y.

Agent pour l'Allemagne : VERLAG CHEMIE, Bergstrasse, Weinheim.

Rédaction : Pour l'envoi des mémoires et tout ce qui concerne la Rédaction, s'adresser au Rédacteur en Chef G. KERSAINT, Laboratoire de Chimie du Muséum d'Histoire Naturelle, 63, rue de Buffon, Paris, 5e, Tél. GOB. 32-64.

SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE

(Fondée en 1908.)

Réunions. — Les réunions de la Société de Chimie Physique ont lieu, en principe, les deuxième et quatrième mercredis de chaque mois pendant la durée de l'année universitaire (de novembre à fin juin), à 17 h dans l'amphithéâtre du Laboratoire de Chimie physique de la Faculté des Sciences, 11, rue Pierre-Curie, à Paris. Les communications y sont toujours suivies de discussions. Il est fait appel pour des conférences à des savants de province et de l'étranger.

La Société possède une section méditerranéenne qui tient séance alternativement à Marseille et à Montpellier.

Admission. — Pour être nommé membre de la Société, il faut être présenté par deux de ses membres; l'élection a lieu dans la séance qui suit celle de la présentation.

Les demandes d'adhésion et la correspondance intéressant la Société doivent être adressées au Secrétaire Général, 10, rue Vauquelin, Paris, 5e.

Printed in France